UNIVERSITATEA DE MEDICINA SI FARMACIE
"GR.T.POPA" IASI
DISCIPLINA DE BIOCHIMIE

B I O C H I M I E M E D I C A L A

Lucrări practice
pentru studenţii facultăţilor de
MEDICINA SI STOMATOLOGIE

dr. M Bucataru

NASTASIA GHEORGHITA, MARIANA PAVEL,
ANICA IACOBOVICI, LUMINITA JERCA

- 1996 -

Scanned with OKEN Scanner

C U P R I N S

Pag.

- Instrucţiuni specifice de protecţia muncii în laborator 1
- Sticlăria, operaţiuni şi aparatura folosită în laborator 4
- Balanţa analitică şi reguli de cântărire 10
- Concentraţia ionilor de hidrogen, noţiunea de pH 12
- Hidroliza sărurilor 14
- Soluţii tampon 15
- Definiţia soluţiilor şi exprimarea concentraţiilor 21
- Titru, factor de normalitate 27
- Acidimetria 33
- Alcalimetria 35
- Permanganometria 37
- Iodometria 41
- Argentometria 41
- Complexometria 43
- Recoltarea şi prelucrarea materialului biologic 46
- ENZIME. Principii de dozare a activităţii enzimatice 55
- Dozarea activităţii lactat dehidrogenazei (LDH) în ser 58
- Izoenzimele lactat-dehidrogenazei 61
- Dozarea activităţii izoenzimei LDH_1 61
- Dozarea activităţii Glucoză-6-P-dehidrogenaza (G_6-PDH) în eritrocite 63
- Dozarea activităţii Glutamat-dehidrogenazei (GL-DH) în plasmă 64
- Punerea în evidenţă a peroxidazelor 67
- Dozarea activităţii catalazei în sânge 69
- Dozarea activităţii transaminazelor 70
- Dozarea activităţii amilazei în ser şi urină . . . . (Metoda Wohlgemuth) 75

Scanned with OKEN Scanner

- Dozarea amilazei în ser şi urină (Metoda colorimetrică după Richterch) 76
- Dozarea activităţii lipazei pancreatice 78
- Dozarea activităţii tripsinei în sucul gastric 80
- Dozarea activităţii colinesterazei serice 81
- Dozarea activităţii fosfatazei alcaline în ser 82
- Dozarea activităţii fosfatazei acide în ser 85
- Dozarea activităţii aldolazei înnser 87
- GLUCIDE. Reacţii calitative ale glucidelor 90
- Dozarea glucozei în sânge (Metoda Hagedorn-Jensen) 92
- Dozarea glucozei în lichidele biologice prin metoda cu orto-toluidină 96
- Dozarea glucidelor urinare (Metoda Ionescu-Matiu) 97
- Dozarea hexozaminelor în ser 101
- LIPIDE. Dozarea lipidelor totale în ser 105
- Dozarea colesterolului total în ser (Metoda Grigaut) 106
- Dozarea colesterolului în ser (Metoda Rappeport) 107
- Dozarea colesterolului din fracţiunile lipoproteice (alfa şi beta) 109
- Dozarea lecitinei în ser 113
- Determinarea corpilor cetonici 116
- PROTEINE. Dozarea proteinelor prin reacţia biuretului . . . 118
- Teste de disproteinemie 120
- Testul Mc Legan 121
- Dozarea ureei prin metoda cu DAM 123
- Dozarea acidului uric în ser - - - 125
- Dozarea acidului uric în urină 126
- Dozarea bilirubinei 129
- Dozarea creatininei în ser şi urină 131
- ELECTROLITI. Dozarea NaCl în sânge 134
- Dozarea clorurilor în ser 135
- Dozarea NaCl în urină (Metoda Mohr) 137
- Dozarea cationilor metalici 139
- Dozarea complexometrică a Ca^{2+} şi Mg^{2+} din ser 141
- Dozarea complexometrică a Ca^{2+} şi Mg^{2+} în urină 143
- Dozarea magneziului cu galben de titan 146
- Dozarea fosforului anorganic în ser 148
-

Scanned with OKEN Scanner

- Dozarea fosforului în urină 149
- Rezerva alcalină 152
- Analiza biochimică a urinii 154
- - examenul chimic al urinii 157
- cercetarea calitativă a proteinelor 157
- cercetarea sângelui şi hemoglobinei în urină 158
- cercetarea glucozei (Reacţia Benedict) 159
- cercetarea acetonei 160
- cercetarea pigmenţilor biliari 161
- cercetarea indicanului în urină 162
- dozarea aciditătii urinare 163
- Metode fizico-chimice de analiză 165
- fotocolorimetria 167
- spectrofotometria 168
- flamfotometria - - - 172
- Valori normale ale principalilor constituenţi chimici din sânge, plasmă sau ser şi urină 180
- B I B L I O G R A F I E

Scanned with OKEN Scanner

INSTRUCTIUNI SPECIFICE DE PROTECTIA MUNCII IN LABORATOARE

In baza legii nr.5/1965 cât şi a normativelor de protecţia muncii elaborate de M.E.I. ce cuprinde instrucţiunile de protecţia muncii pentru laboratoarele de chimie şi biologie:

1. Purtarea halatului este obligatorie pentru orice persoană care lucrează în laborator. Halatul va fi confecţionat din pânză de bumbac albă, nu din material plastic. Halatul se va deschide în faţă nu la spate.

- Pentru evitarea aprinderii părului, mai ales la femei, acesta se va purta strâns la spate, eventual se va purta bonetă.

- La extracţia cu solvenţi organici cu pâlnie de separare se va avea grijă să nu se formeze suprapresiune în pâlnie care să stropească pe executant.

- Evaporarea solvenţilor se va face numai pe baie de nisip electrică sub nişă.

- Acizii minerali şi hidroxizii concentraţi, hârtiile şi eprubetele sparte nu se aruncă la chiuvetă.

- Aparatele electrice (ultracentrifugă, termostate,frigidere spectrofotometre etc.) trebuie să aibă prize împământate si izolaţie perfectă. Fixarea lor în priză se face numai cu mâna uscată.

- Gazul metan: la intrarea în cameră se observă dacă nu există miros de mercaptan. Când se simte miros se sting flăcările, nu se acţionează întrerupătoarele electrice, se deschid uşile şi ferestrele pentru aerisire şi se anunţă serviciul tehnic pentru remediere.

- Aprinderea se face apropiind flacăra de becul arsător. Se deschide robinetul de gaz. La sfârşit, robinetul se închide cu grijă Focul nu se lasă nesupravegheat.

- După terminarea activităţii se controlează dacă aparatura electrică a fost scoasă din priză şi robinetele de apă închise.

- Operaţiile de încălzire se efectuează în vase rezistente, agitând lichidul în timpul încălzirii.

- La încălzirea unui lichid în eprubetă se va avea grijă ca

gura acesteia să nu fie îndreptată spre cel ce o manipulează sau spre alte persoane din jur. Eprubeta se va agita continuu pentru a nu se sparge prin supraîncălzire.

- La manipularea vaselor de sticlă, acestea vor fi verificate înainte de folosire.

- Sticlele cu reactiv sau borcanele cu substanţe vor fi etichetate (numele substanţei, puritatea sau concentraţia soluţiei).

- Turnarea soluţiilor din sticlă se face pe partea opusă etichetei pentru ca eventual soluţia care se prelinge să nu distrugă eticheta.

- Principalele substanţe toxice: acid cromic (bicromat şi acid sulfuric), compuşi de arseniu, plumb, mercur, cianuri, fenoli, săruri de bariu, pesticide.

- Principalele substanţe inflamabile: acetona, alcoolul metilic, alcoolul etilic, acetatul de etil, acetatul de butil, benzen, eter etilic, eter de petrol etc.

- Manipularea sticlelor se face cu grijă ţinând sticla atât de fund cât şi de gât. Nu se vor lăsa sticle descoperite.

- Pipetarea produselor biologice se va face cu pipete prevăzute cu filtre de vată.

- Pipetarea acizilor concentraţi şi a bazelor se face cu pipete de volum mai mare decât volumul de pipetat şi prevăzute cu filtre de vată.

- Bromul se măsoară numai sub nişă, cu pipete cu bulă prevăzute cu pară de cauciuc pentru aspirare.

- Acidul sulfuric diluat se prepară prin turnarea acidului concentrat în apă şi nu invers.

- Incăperea în care se lucrează cu acizi minerali, apă de brom, solvenţi organici, trebuie să fie prevăzută cu nişă sau ventilaţie electrică.

- Cromatografia şi electroforeza se efectuează în încăperi izolate de restul laboratorului şi prevăzute cu ventilatoare electrice.

- Podelele laboratoarelor nu se mătură, se spală cu apă, sodă, detergenţi sau soluţii antiseptice (fenoli, lizol, crezol).

- Este interzisă păstrarea alimentelor în frigiderele cu produse biologice pentru a evita pericolul de infectare.

PRIM AJUTOR IN CAZ DE ACCIDENTE

1. Arsuri termice. Pentru arsurile cu suprafață mică și fără profunzime, se recomandă ungerea cu soluție concentrată de tanin, acesta făcând să dispară durerea și să nu se formeze băşici.

- In cazul când arsurile au suprafață mare sau sunt profunde nu se va întrebuința în nici un caz tanin, ci se vor îndepărta din rană eventualele substanțe toxice sau corozive prin spălare și se va cere ajutorul medicului.

2. Arsuri chimice. Se vor îndepărta hainele stropite cu reactiv și se va spăla repede pielea cu multă apă după care se face neutralizarea.

a. La arsurile cu acid se va spăla suprafata cu bicarbonat de sodiu 2% până la neutralizare.

b. La arsurile cu alcalii se va spăla rana cu o soluție de acid boric 1% sau acid acetic. După neutralizare, locul arsurii se unge cu vaselină și se aplică deasupra un pansament.

- In cazul pătrunderii unor substanțe corozive în ochi, aceștia se vor spăla imediat cu apă sau cu o soluție neutralizantă cu ajutorul unei pipete sau a păhărelului special de spălat ochii.

3. In cazuri de otrăvire cu metale grele, se dă accidentatului să ingere cantități mari de lapte pentru eliminarea rapidă a toxicului din stomac, se folosesc emetizante, după care se administrează tratament medicamentos.

4. Răni prin tăiere. Dacă în rană rămân corpuri străine, cioburi de sticlă, acestea trebuie îndepărtate numai de medic.

- Fiecare laborator trebuie să fie dotat cu trusă de prim ajutor care să cuprindă medicamente și material sanitar strict necesar (antinevralgice, cardiotonice, antibiotice, antiseptice, calmante, feșe tifon).

Scanned with OKEN Scanner

STICLARIA, OPERATIUNI SI APARATURA FOLOSITE IN LABORATOR

Pentru efectuarea unei analize cantitative se execută diferite operaţii pentru care sunt necesare ustensile de laborator care pot fi confecţionate din sticlă, porţelan, lemn, metal, mase plastice.

Una din cele mai importante operaţii este dizolvarea care precede orice analiză chimică, deoarece majoritatea reacţiilor au loc în soluţii.

Dizolvarea substanţei în diferiţi solvenţi se încearcă luînd-o în porţiuni mici în eprubetă, care este cel mai simplu vas de laborator: un tub de sticlă cu fund rotund de diferite mărimi.

Eprubetele sunt de mai multe feluri: eprubete obişnuite, eprubete gradate, eprubete de centrifugă, eprubete de hemoliză.

Dacă substanţa este solidă, pentru a grăbi solubilizarea, trebuie întâi pulverizată cât mai fin, folosind mojarul care poate fi din porţelan, sticlă, agat sau oţel. El este format dintr-o capsulă cu pereţi groşi, cu fund plat şi dintr-un pistil tot din porţelan, sticlă, agat sau oţel.

In operaţiile de dizolvare, precipitarea (transformarea unei substanţe din soluţie sau a unui component solubil al acesteia, într-o combinaţie greu solubilă) se folosesc: pahare Berzelius care au forma unor pahare obişnuite cu marginile îndoite în afară, cu cioc sau fără cioc, de diferite capacităţi; flacoanele Erlenmeyer se prezintă sub forma unor vase de formă conică, largi la partea inferioară şi înguste la partea superioară; baloanele care sunt de diferite tipuri: cu fund rotund sau plat, cu tubulură laterală (baloane Wurtz).

Pentru cristalizări se folosesc cristalizoarele, confecţionate din sticlă şi având fund plat.

Dintr-un amestec solid-lichid, componenţii se pot separa prin decantare, filtrare sau centrifugare.

Decantarea este operaţia de trecere a lichidului limpede de deasupra sedimentului în alt vas prin transvazare.

Filtrarea este operaţia de separare a fazelor unui sistem neomogen (lichid-solid), prin utilizarea unor medii filtrante poroase

Eprubetă

Mojar

Pahar Berzelius

Flacon Erlenmeyer

Balon cu fund rotund

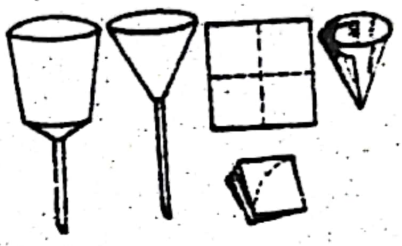
Balon cu fund plat

Cristalizor

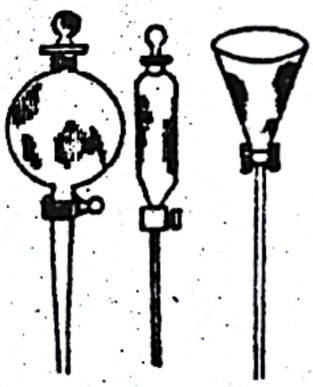
Balon Wurtz

Creuzet, capsulă de porțelan

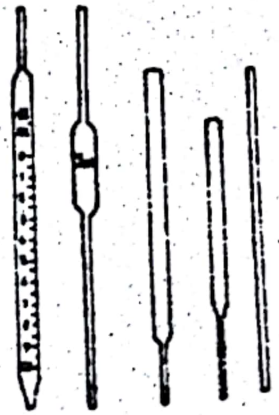
Scanned with OKEN Scanner



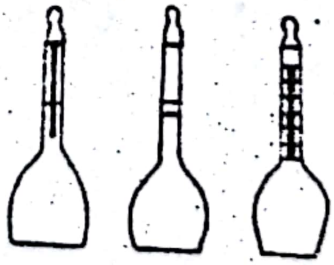
Pâlnie cu placă poroasă, pâlnie simplă,
tehnica așezării hârtiei de filtru



Pâlnii de separare

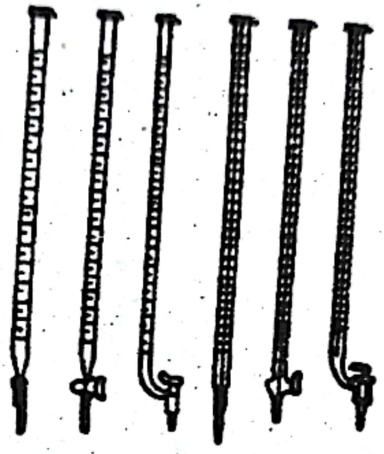


Pipete, baghete

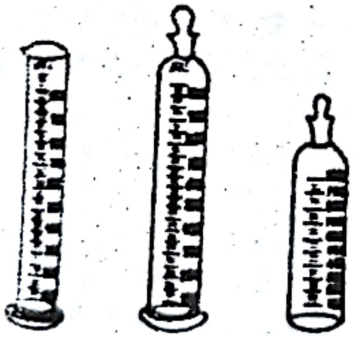


Baloane cotate

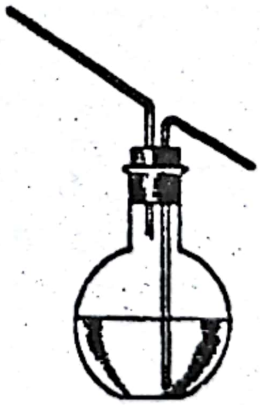
Scanned with OKEN Scanner



Biurete



Cilindri gradați



Pisetă

Scanned with OKEN Scanner

care permit trecerea lichidului, reţinând solidul. Ca material filtrant se utilizează în laborator hârtia de filtru, azbestul, vata, vata de sticlă, plăci poroase de sticlă sau porţelan. Pentru filtrare sunt necesare pâlnii, care sunt de sticlă sau de porţelan. Pâlniile obişnuite din sticlă trebuie să aibă unghiul conului de 60° şi tubul de scurgere nu prea larg, dar de 2-3 ori mai lung decât înălţimea conului, cu capătul tăiat oblic, pentru a accelera filtrarea.

Filtrările în vid se execută cu ajutorul pâlniilor Buchner, care sunt confecţionate din porţelan sau sticlă groasă cu fundul perforat pe care se aşează hârtia de filtru. Se mai folosesc şi creuzetele Coech.

Hârtia de filtru este de două feluri: calitativă şi cantitativă; după mărimea porilor poate fi de diferite calităţi: a) hârtie cu bandă neagră, are porozitatea mare, filtrarea se face uşor, dar nu reţine bine precipitatul; b) hârtia cu bandă albă, are porozitate medie; c) hârtie cu bandă albastră, are porozitatea foarte mică, reţine cele mai mici urme de precipitat.

Aceste hârtii de filtru au diferite diametre, utilizându-se cea de dimensiunea cerută după cantitatea de precipitat.

Pentru mărirea vitezei de filtrare, se utilizează filtre pliante folosite în cazul precipitatelor voluminoase şi gelatinoase când interesează numai soluţia filtrată, precipitatul de pe filtru urmând să fie îndepărtat din lucru.

Filtrarea poate fi grăbită prin creşterea presiunii deasupra lichidului de filtrat, sau prin micşorarea presiunii sub filtrul pe care se decantează soluţia, aceasta putându-se realiza prin sugerea filtratului, în filtrarea la vid.

Centrifugarea este o decantare grăbită prin forţa centrifugă. Se foloseşte în special în seminicroanaliză pentru separarea rapidă a unor cantităţi mici de precipitat, sau în cazul în care precipitatele se filtrează greu (precipitate gelatinoase).

Centrifuga electrică are un număr de 1500-4000 ture/minut.

Se folosesc eprubete speciale din sticlă sau plastic care se aşează în nişte cartuşe metalice, trebuie să aibă aceeaşi greutate şi încărcate în mod egal, pentru a evita vibraţiile puternice care deteriorează centrifuga.

Pentru aducerea la semn în vasele de măsură, se foloseşte pisseta în care se păstrează apa distilată necesară lucrului.

Pentru încălzirea sau evaporarea soluţiilor, precum şi pentru calcinarea precipitatelor se folosesc în laborator capsule şi creuzete din porţelan, cuartz, fier, aur, platină, argint.

In efectuarea multor experienţe este nevoie de căldură. In laborator se folosesc pentru încălzire becuri de gaz. Pentru a se evita spargerea vaselor din sticlă, acestea nu se încălzesc direct la flacără, ci cu ajutorul sitei de azbest; vasele se aşează fie pe trepiede, fie pe inele montate pe stative şi cleme.

Pentru mânuirea obiectelor fierbinţi se foloseşte cleştele. Ca suport pentru creuzete, când se face încălzirea sau calcinarea la flacără, se foloseşte triunnghiul cu şamotă ce se aşează pe trepied.

Operaţia de <u>evaporare</u> a lichidelor se execută pe băi de apă care servesc la încălzirea sub 100°C. Băi cu nisip sau băi cu ulei se folosesc când temperatura trebuie să fie 200-300°C.

Operaţia de <u>uscare</u> a substanţelor se face cu etuve electrice de obicei sub formă paralelipipedică care permit încălzirea până la 200°C.

Când sunt prevăzute cu termoregulatoare, în aşa fel încât temperatura din interior să se menţină constantă între limitele stabilite (de ex.37°C) se numesc <u>termostate</u>.

Pentru păstrarea substanţelor în stare uscată, sau pentru uscarea unor substanţe se foloseşte <u>exicatorul</u>, un vas de sticlă cu pereţii groşi, lat la bază, care apoi se îngustează formând un picior. In acest vas se aşează o placă de porţelan sau de sticlă cu găuri de diferite mărimi, pe care se aşează obiectele cu substanţă. La fundul vasului se pune o substanţă higroscopică (H_2SO_4 conc. sau $CaCl_2$). Vasul este acoperit cu un capac şlefuit a cărui margine este unsă cu vaselină, pentru ca închiderea să se facă ermetic.

In cazul unui amestec heterogen lichid-lichid (apă şi ulei sau benzen şi apă), acestea se pot separa prin lăsarea în repaus, când lichidele se separă în straturi distincte după densitatea lor. Stratul superior se poate decanta, iar stratul inferior se poate uşor separa folosind o pîlnie cu robinet numită <u>pâlnie de separare</u>. Amestecul de separat se introduce în pâlnie astfel ca să ocupe 2/3 din volumul total. In cazul unui amestec omogen lichid-lichid, componenţii se pot separa prin distilare, datorită diferenţei dintre temperaturile de fierbere.

VASE PENTRU MASURAREA VOLUMELOR

Vasele pentru măsurarea volumelor sunt confecţionate din sticlă cu o rezistenţă chimică mare şi stabilă la variaţii de temperatură. Se clasifică în două mari clase:

1. Vase gradate pentru umplere, al căror semn indică volumul pe care îl măsoară. Acestea sunt:

- baloanele cotate cu fund plat, gât lung şi îngust, având pe ele un semn în formă de cerc, care arată limita de umplere a balonului cu lichid. Pe balon este marcată temperatura la care a fost calibrat (de obicei 20°C);

- cilindrii gradaţi, vase gradate care au pe lungime diviziuni în ml. Pot fi de diferite capacităţi de la 5 ml la 2000 ml, cu dop şi fără dop. Se întrebuinţează la măsurări aproximative.

2. Vase gradate pentru golire, al căror semn indică până unde se umple vasul, ca apoi golirea să măsoare volumul indicat în gradaţia corespunzătoare. Acestea sunt: pipete, biurete, micropipete.

Pipetele obişnuite sunt de 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml.

Micropipetele sunt de 0,1 ml, 0,2 ml, 0,5 ml, 1 ml.

Biuretele sunt vase de golirealcătuite dintr-un tub gradat, care la partea inferioară au un dispozitiv cu ajutorul căruia se poate închide sau regla curgerea lichidului, acesta poate fi un tub de cauciuc şi o clemă. Cele mai bune biurete sunt cele cu robinet, care se ung cu puţină unsoare astfel ca robinetul să meargă uşor.

Biuretele servesc la introducerea treptată a unui reactiv într-o probă, în final urmărindu-se volumul de reactiv utilizat. Citirile la biuretă se fac la nivelul meniscului inferior la lichidele incolore şi care udă pereţii vasului, sau la nivelul meniscului superior pentru lichidele colorate şi care nu udă pereţii vasului (de exemplu mercur).

CURATIREA STICLARIEI DE LABORATOR

Inainte de a se folosi sticlăria de laborator trebuie bine curăţată. Eprubetele, baloanele Erlenmeyer, paharele Berzelius se spală cu apă de robinet cu o perie, apoi se clătesc cu apă distilată. Când vasul este foarte murdar, se folosesc amestecuri oxidante (bicromat de potasiu şi acid sulfuric) numit amestec sulfo-cromic.

BALANTA ANALITICA SI REGULI DE CANTARIRE

Unul din cele mai importante aparate întrebuinţate în ori ce

metodă de analiză cantitativă este balanţa analitică.

Balanţele folosite în laborator sunt:

a) Balanţe de precizie, cu care se poate cântări până la o precizie de o,ol g sau chiar până la o,ool g,acestea fiind balanţe farmaceutice cu capacitatea de cântărire până la 5o g sau loo g.

b) Balanţe analitice care pot cântări până la a patra zecimală dintr-un gram (o,oool g=10^{-4}g), care au o sensibilitate de ± O,1 mg. Mai sunt şi microbalanţele care au o precizie de 10^{-6} g.

Greutăţile analitice se păstrează într-o cutie specială fiind aşezate în ordinea: 100-50-20-10-10-5-2-2-1 g, manipulate numai cu penseta.

Balanţa analitică este un aparat de mare sensibilitate şi valoare de aceea la manipularea ei se vor respecta următoarele reguli:

- substanţa se cântăreşte într-o fiolă, sau pe sticlă de ceas;
- nu este permisă încărcarea balanţei peste greutatea pe care poate să o suporte şi care este înscrisă pe balanţă;
- adăugarea şi scoaterea obiectelor de cântărire sau a greutăţilor se face după ce balanţa a fost oprită;
- materialele de cântărit trebuie să aibă temperatura mediului ambiant, ca şi balanţa;
- deschiderea şi închiderea balanţei se face fără şocuri;
- în timpul cântăririi se lucrează numai prin uşiţe laterale ale cutiei balanţei;
- balanţa trebuie să fie menţinută într-o perfectă stare de curăţenie;
- în interiorul dulăpiorului se introduce o capsulă cu $CaCl_2$ anhidră sau altă substanţă higroscopică (silicagel) pentru a se păstra o atmosferă uscată;
- balanţa se aşează într-o cameră specială pe o masă-consolă care nu dă trepidaţii. Camerele de balanţă trebuie să aibă o temperatură constantă.

Metode de cântărire

Cele mai importante metode de cântărire sunt următoarele:

A. Cântărirea simplă sau directă: se aşează pe talerul din stânga obiectul de cântărit, iar greutăţile pe talerul din dreapta până la echilibru.

B. Metoda dublei cântăriri: punem corpul de cântărit pe

platanul stâng şi-l echilibrăm cu greutăţi (P) puse pe platanul drept, apoi inversăm: unde a fost corpul punem greutăţile şi unde au fost greutăţile punem corpul de cântărit (P'). Media aritmetică a celor două cantăriri $\frac{P + P'}{2}$ g reprezintă greutatea corpului.

C. Metoda lui Mendeleev: se pune pe un platan oarecare, o greutate care să nu întreacă încărcătura maximă a balanţei. Pe celălalt platan se pun greutăţile mici până la restabilirea greutăţii. Pe platanul cu greutăţi mici se pune corpul de cântărit, care va strica echilibrul balanţei. Pentru a restabili echilibrul se scot din greutăţi exact cât masa corpului de cântărit. Deci suma greutăţilor scoase reprezintă greutatea corpului de cântărit. De exemplu:

20 g = sticla de ceas + 1,4522

20 g = sticla de ceas + 0,1784 + substanţă

0,2738 g substanţă cântărită

D. Metoda tarării (Borda): se aşează pe talerul din stanga, obiectul de cântărit; pe talerul din dreapta se pun alice de plumb (tara), până la stabilirea echilibrului, se ridică obiectul de cântărit şi se introduc în locul lui greutăţi până la restabilirea echilibrului. Suma greutăţilor introduse reprezintă masa obiectului de cantărit.

CONCENTRATIA IONILOR DE HIDROGEN, NOTIUNEA DE pH

Apa reprezintă unul din cei mai frecvenţi solvenţi, majoritatea reacţiilor având loc în mediul apos.

Printr-o serie de experienţe, s-a demonstrat că o foarte mică parte din moleculele de apă se găsesc disociate în ioni, conform ecuaţiei:

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$$

Aplicând legea maselor, ecuaţiei de mai sus, vom avea:

$$\frac{(H^+)(OH^-)}{(H_2O)} = K_{H_2O}$$

Deoarece această constantă este foarte mică, concentraţia activă a moleculelor de apă nedisociată (H_2O) se poate socoti egală cu concentraţia lor iniţială, deci poate fi considerată o mărime constantă, iar expresia de mai sus se poate scrie:

$$K_{H_2O} \cdot (H_2O) = (H^+) \cdot (OH^-)$$

Produsul $(H^+)(OH^-)$ a fost denumit "produs ionic al apei", P_{H_2O} şi are valoarea de $1,00 \times 10^{-14}$ la 22^0C sau $P_{H_2O} = 10^{-14}$

La punctul de neutralizare al apei, când $(H^+)=(OH^-)$ produsul ionic devine:

$$(H^+)(OH^-) = (H^+)^2 = (OH^-)^2 = P_{H_2O} \text{ de unde}$$

$$(H^+) = (OH^-) = P_{H_2O} = 10^{-14} = 10^{-7}$$

O concentraţie de ioni de H^+ mai mare ca 10^{-7}, va indica o reacţie acidă a apei, iar o concentraţie mai mică ca 10^{-7}, o reacţie alcalină.

Valoarea concentraţiei ionilor de hidrogen deci, ne poate da indicaţii preţioase în aprecierea reacţiei mediului care ne interesează (acidă, neutră sau alcalină), la punctul de neutralitate ionică, concentraţia în ioni de hidrogen fiind 10^{-7}; $(H^+) = 10^{-7}$ la $t=22^oC$).

Deoarece concentraţia ionilor de hidrogen se exprimă printr-o valoare a lui 10 exponenţial negativă, ceea ce produce dificultăţi în calcule, s-a convenit să se considere în locul acestor valori, logaritmul cu semn schimbat al concentraţiei ionilor de hidrogen, sau logaritmul inversului acestuia, sau încă cologaritmul acestuia. Această valoare a primit denumirea de "pH".

$$pH = - \log (H^+) = \log \frac{1}{(H^+)} = \text{colog } (H^+)$$

- <u>In cazul soluţiilor neutre</u>, conform celor indicate, $(H^+) = 10^{-7}$

$$pH = - \log (H^+) = - \log 10^{-7} = 7$$

- <u>In cazul acizilor tari</u>, întrucât acizii tari disociază total, concentraţia în ioni de hidrogen va fi egală cu concentraţia acidului. Considerând acizi tari de diverse normalităţi, pH-ul acestora este dat în tabelul de mai jos, din care se constată că: pH-ul soluţiei acide variază în sens invers cu concentraţia ionilor de H^+, având valori cuprinse între 0 - 7; un pH mare indică o concentraţie mică de ioni de (H^+). In timp ce (H^+) scade de 10 ori, pH-ul creşte cu o unitate.

n	1	0,1	C,01	0,001	0,0001	0;00001	0,000001	0,0000001
(H^+)	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
pH	0	1	2	3	4	5	6	7

- In cazul bazelor tari, trebuie să se ţină seama de concentraţia în ioni de OH^- care caracterizează aceste soluţii.

Să considerăm reacţia de disociere a apei:

$(H^+)(OH^-) = 10^{-14}$; logaritmând această reacţie avem:

$\log (H^+) + \log (OH^-) = \log(10^{-14})$

Ţinând seama de definiţia dată pH-ului, $-\log(H^+)$ prin analogie cu aceasta, $-\log (OH^-)$ poate fi exprimat prin pOH; relaţia de mai sus devine:

$-pH - pOH = -14$ sau $pH + pOH = 14$

de unde $pH = 14 - pOH$

Ca şi în cazul acizilor, considerând baze de diverse normalităţi folosite în laborator, pH-ul acestora este dat de tabelul de mai jos, din care se constată că: pH-ul soluţiilor alcaline variază în acelaşi sens cu concentraţia ionilor de OH^-, adică la scăderea concentraţiei ionilor de OH^- scade şi pH-ul, având valori cuprinse între 7 - 14; un pH mare indică o concentraţie mare în ioni de OH^- iar un pH mic, indică o concentraţie mică în ioni de OH^-.

pH-ul acestor soluţii variază în sens invers cu pOH-ul; în timp ce pH-ul creşte, pOH-ul descreşte.

n	0,0000001	0,000001	0,00001	0,0001	0,001	0,01	0,1	1
(HO^-)	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	10^{0}
pOH	7	6	5	4	3	2	1	0
pH	7	8	9	10	11	12	13	14

Din aceste tabele, se constată că la neutralitate, pH = 7; într-un mediu acid pH 7 şi într-un mediu bazic pH 7.

HIDROLIZA SARURILOR

Unele săruri atunci când sunt dizolvate în apă suferă hidroliză. Astfel, sărurile formate dintr-un acid tare cu o bază slabă, dintr-un acid slab cu o bază tare şi dintr-un acid slab cu o bază slabă, au proprietatea de a reacţiona direct cu ionii apei, pentru a reface acidul, respectiv baza slabă din care au provenit. Această proprietate poartă denumirea de "hidroliză" sărurile respective fiind denumite "hidrolizabile".

- Sărurile provenite dintr-un acid tare şi o bază slabă, suferă o hidroliză acidă, întrucât în soluţie rămân liberi ionii H^+ ai apei:

$$A^-B^+ + HOH \longrightarrow A^-H^+ + BOH \text{ (bază slabă)}$$

- Sărurile provenite dintr-un acid slab şi o bază tare, suferă o hidroliză bazică deoarece în soluţie rămân liberi ionii OH^- ai apei:

$$A^-B^+ + HOH \longrightarrow \underset{\text{(acid slab)}}{HA} + B^+ + OH^-$$

- Sărurile provenite dintr-un acid slab şi o bază slabă, vor suferi o hidroliză acidă sau bazică, după cum acidul este mai tare sau invers:

$$A^-B^+ + HOH \longrightarrow \underset{\text{(acid slab)}}{HA} + \underset{\text{(bază tare)}}{BOH}$$

In ceea ce priveşte sărurile provenite din acizi tari şi baze tari, acestea nu hidrolizează.

Datorită acestor reacţii de hidroliză, unele săruri care aparent sunt neutre, atunci când sunt dizolvate în apă, pot da soluţii cu reacţie acidă sau bazică.

SOLUTII TAMPON

Prin soluţii tampon se înţeleg acele soluţii care au proprietatea de a se opune variaţiei valorii pH-ului.

Ca soluţii tampon pot funcţiona aşa numitele "sisteme tampon" şi amfoliţii de tipul aminoacizilor.

Cele două grupe de soluţii tampon se deosebesc doar prin aceea că sistemul tampon este constituit din două substanţe dintre care una neutralizează ionii de H^+ din soluţie, iar cealaltă ionii HO^-, în timp ce amfoliţii reprezintă una şi aceeaşi substanţă care îndeplineşte acest rol.

Sisteme tampon. Cel mai simplu sistem tampon este constituit dintr-un acid slab şi sarea sa hidrolizabilă (sarea sa formată cu o bază tare), sau dintr-p bază slabă şi sarea respectivă hidrolizabilă (sarea sa formată cu un acid tare), ca de exemplu:

I	CH_3COOH	II	NH_4OH
	CH_3COONa		NH_4Cl

Modul de funcţionare a sistemului tampon; dacă în prezenţa

unui asemenea sistem tampon, se adaugă un acid tare (HCl), dintre cele două substanţe care formează sistemul tampon, va interveni acetatul de sodiu după reacţia:

$$(Na^+ + CH_3COO^-) + (H^+ + Cl^-) \longrightarrow CH_3COOH + Na^+ + Cl^-$$

în care se vede că s-a format CH_3COOH puţin disociat, pH-ul sistemului nu variază sensibil.

Dacă la acelaşi sistem se introduc acum ioni de OH^- proveniţi din adăugarea de baze tari (NaOH), va interveni de data aceasta cea de a doua substanţă a sistemului tampon, CH_3COOH, după reacţia:

$$CH_3COO^- + H^+ + Na^+OH^- \longrightarrow CH_3COO^- + Na^+ + H_2O$$

Prin formarea apei, pH-ul sistemului nu variază sensibil. Deci şi într-un caz şi în altul, cele două substanţe ale sistemului tampon se opun variaţiei pH-ului. Al doilea sistem tampon va funcţiona similar.

Dacă în prezenţa unui asemenea sistem tampon se adaugă un acid tare (HCl), va interveni NH_4OH, după reacţia:

$$NH_4OH + Cl^- + H^+ \longrightarrow H_2O + NH_4 + Cl^-$$

când se va forma apa care nu variază sensibil pH-ul soluţiei.

Dacă s-ar introduce ioni HO^- prin adăugarea unei baze tari (NaOH), va interveni NH_4Cl, după reacţia:

$$NH_4^+ + Cl^- + Na^+ + HO^- \longrightarrow NH_4OH + Na^+ + Cl^-$$

formându-se bază slabă NH_4OH, pH-ul nu variază sensibil.

Un sistem tampon mult folosit este sistemul:

$$NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4$$

La adăugare de mici cantităţi de acid tare (HCl) în aceste soluţii tampon, intervine ca tampon fosfatul disodic, conform reacţiei:

$$\underset{\text{sare cu hidroliză alcalină}}{Na_2HPO_4} + HCl \longrightarrow NaH_2PO_4 + Na^+ + Cl^-$$

Invers, la adăugarea de bază tare (NaOH) intervine ca tampon fosfatul monosodic, conform reacţiei:

$$\underset{\text{sare cu hidroliză acidă}}{NaH_2PO_4} + NaOH \longrightarrow Na_2HPO_4 + H_2O$$

In ambele cazuri pH-ul variază sensibil.

In organism, asemenea mecanisme sunt asigurate de sisteme tampon de tip acid carbonic/bicarbonat de Na; hemoglobină/hemoglobinaţi.

Cele mai utilizate sisteme tampon sunt:

1. Fosfat disodic - fosfat monopotasic M/15 (pH=5-8)
   - Sol.A: $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ - 11,866 g
     Apă distilată până la 1000 ml
   - Sol.B: KH_2PO_4 - 9,073 g
     Apă distilată până la 1000 ml
2. Glicocol - HCl (pH= 1,1-3,5)
   - Sol.A: Glicocol - 7,507 g
     NaCl - 5,84 g
     Apă distilată până la 1000 ml
   - Sol.B: HCl 0,1 N
3. Glicocol - NaOH (pH=8,6-12,9)
   - Sol.A: Glicocol - 7,507 g
     NaCl - 5,84 g
     Apă distilată până la 1000 ml
   - Sol.B: NaOH 0,1 N
4. Citrat - HCl (pH=1.1-4,9)
   - Sol.A:Acid citric - 21,014 g în 100 ml apă
     NaOH N - 200 ml
     Apă distilată până la 1000 ml
   - Sol.B: HCl 0,1 N
5. Citrat - NaOH (pH=5-6,6)
   - Sol.A: citrat (aceeaşi soluţie ca la 4)
   - Sol.B: NaOH 0,1 N
6. Borat - HCl (pH=7,8-8,9)
   - Sol.A: Acid boric - 12,367 g în 100 ml apă
   - NaOH 1 N - 100 ml
   - Apă distilată până la 1000 ml
   - Sol.B: HCl 0,1 N
7. Borat - NaOH (pH=9,3-11,0)
   - Sol.A: aceeaşi soluţie ca la 6
   - Sol.B: NaOH 0,1 N
8. Tris - HCl (pH=7,2-9,1)
   - Sol.A: Tris (hydroximetilaminometan) - 0,2 M (24,23 g)
     Apă distilată până la 1000 ml
   - Sol.B: HCl 0,1 N
9. Tris - maleat (pH=5,2-8,6)
   - Sol.A: tris 0,2 M (24,23 g)

Scanned with OKEN Scanner

anhidridă maleică - 19,8 g
Apă distilată până la 1000 ml

Sol.B:NaOH 0,2 M

Tamponul Tris - HCl

pH	Tris 0,2 M ml	HCl 0,1 N ml	Apă dist. ml
7,2o	25	45	13o
7,36	25	42,5	132,5
7,54	25	4o	135
7,66	25	37,5	137,5
7,77	25	35	14o
7,87	25	32,5	142,5
7,96	25	3o	145
8,o5	25	27,5	147,5
8,14	25	25	15o
8,23	25	22,5	152,5
8,32	25	2o	155
8,4o	25	17,5	157,5
8,5o	25	15	16o
8,62	25	12,5	162,5
8,74	25	1o	165
8,92	25	7,5	167,5
9,1o	25	5	17o

Tampon Tris - maleat

pH	Tris o,2 M ml	NaOH o,2 M ml	Apă dist. ml
5,2	5o	7	143
5,4	5o	1o,8	139,2
5,6	5o	15,5	134,5
5,8	5o	2o,5	129,5
6,o	5o	26,o	124
6,2	5o	31,5	117,5
6,4	5o	37	113
6,6	5o	42,5	1o7,5
6,8	5o	45	1o5

Scanned with OKEN Scanner

pH	Tris o,2 M ml	N_aOH o,2 M ml	Apă dist. ml
7,o	5o	48	1o2
7,2	5o	51	99
7,4	5o	54	96
7,6	5o	58	92
7,8	5o	63	87
8,o	5o	69	81
8,2	5o	75	75
8,4	5o	81	69
8,6	5o	86,5	63,5

Amestecuri tampon după Soerensen pentru pH 1,1 - 12,9 (20°C)

pH	Glicocol ml	HCl ml	Citrat ml	HCl ml
1,1	5,7	94,3	4,8	95,2
1,2	14,6	85,4	11,1	88,9
1,3	22,6	77,4	15,9	84,1
1,4	28,9	71,1	19,3	8o,7
1,5	33,8	66,2	22,2	77,8
1,6	38,o	62,o	24,6	75,4
1,7	41,7	58,3	26,5	73,5
1,8	45,3	54,7	28,2	71,8
1,9	48,9	51,1	29,5	7o,5
2,o	51,9	48,1	3o,6	69,4
2,1	54,9	45,1	31,7	68,3
2,2	57,6	42,4	32,6	67,4
2,3	6o,3	39,7	33,6	66,4
2,4	63,4	36,6	34,5	65,5
2,5	66,6	33,4	35,4	64,6
2,6	69,9	3o,1	36,4	63,6
2,7	72,8	27,2	37,3	72,7
2,8	76,o	24,o	38,3	61,7
2,9	79,2	2o,8	39,3	6o,7
3,o	82,1	17,9	4o,3	59,7

Scanned with OKEN Scanner

pH	Glicocol	HCl ml	Citrat ml	HCl ml
3,1	84,8	15,2	41,5	58,5
3,2	87,1	12,9	42,7	57,3
3,3	89,2	10,8	44,0	56,0
3,4	91,0	9,0	45,4	54,6
3,5	92,5	7,5	46,8	53,2

pH	Citrat ml	HCl ml	NaOH ml	Na_2HPO_4 ml	KH_2PO_4 ml
3,6	48,4	51,6			
3,7	50,1	49,9			
3,8	51,9	48,1			
3,9	53,8	46,2			
4,0	56,0	44,0			
4,1	58,5	41,5			
4,2	61,1	38,9			
4,3	64,3	35,7			
4,4	67,9	32,1			
4,5	71,9	28,1			
4,6	76,9	23,1			
4,7	82,2	17,8			
4,8	88,0	12,0			
4,9	95,6	4,4			
5,0	96,4		3,6	0,95	99,5
5,1	90,3		9,7	1,35	98,65
5,2	85,1		14,9	1,8	98,2
5,3	80,4		19,6	2,3	97,7
5,4	76,3		23,7	3,0	97,0
5,5	72,3		27,7	3,9	96,1
5,6	69,0		31,0	4,9	95,1
5,7	66,0		34,0	6,2	93,8
5,8	63,6		36,4	7,9	92,1
5,9	61,5		38,5	9,8	90,2
6,0	59,6		40,4	12,1	87,9
6,1	58,0		42,0	15,0	85,0
6,2	56,6		43,4	18,4	81,6

Scanned with OKEN Scanner

DEFINITIA SOLUTIILOR SI EXPRIMAREA CONCENTRATIILOR

O soluţie este un amestec omogen, constituit din cel puţin două componente: una care predomină denumită dizolvant, alta sau altele care se dispersează omogen în prima fază şi se numeşte dizolvant.

Exprimarea cantităţii de substanţă dizolvată într-o soluţie la un anumit volum, poartă numele de concentraţia soluţiei şi se poate exprima în moduri diferite:

1. Concentraţie procentuală % poate exprima: numărul de grame de substanţă dizolvată în 1oo grame de soluţie (g/g); numărul de grame de substanţă dizolvată în 1oo ml soluţie (g/v); numărul de mililitrii de substanţă dizolvată în 1oo mililitrii de soluţie (v/v).

2.a) Concentraţia molară exprimă numărul de molecule gram dizolvate la 1 litru de soluţie. Astfel, soluţiile care conţin um mol de substanţă la 1ooo ml se numesc "soluţii molare" şi se notează cu "M". Soluţiile care conţin 2 sau 3 moli de substanţă la 1ooo ml se numesc "soluţii dimolare" respectiv "trimolare" notate cu "2M" sau "3M"; cele care conţin jumătate din molecula de substanţă dizolvată la 1ooo ml se numesc "demimolare" notate cu "o,5M".O soluţie milimolară conţine 1 mM (mili Moli), iar o soluţie micromolară conţine 1 umol substanţă la 1ooo ml soluţie.

Cunoscând molaritatea (M) unei soluţii se poate afla cantitatea de substanţă dintr-un litru de soluţie:

M x greutatea moleculară = g substanţă/litru

Cunoscând cantitatea de substanţă la litru de soluţie se poate calcula molaritatea după relaţia:

$$M = \frac{\text{g substanţă/litru}}{\text{greutate moleculară}}$$

Pentru anumite scopuri, se exprimă concentraţia unei soluţii şi prin "molalitate" (concentraţia molală notată cu "m"), reprezintă numărul de grame de substanţă dizolvată la 1ooo grame dizolvant.

Diferenţa deci dintre "molaritate" şi "molalitate" constă în aceea că în primul caz, numărul de moli de substanţă (mol.g) este raportat la 1ooo ml soluţie, iar în cel de al doilea caz, acelaşi număr de moli de substanţă este raportat la 1ooo g dizolvant.

b) Soluţii izotonice

Se ştie că presiunea osmotică este direct proporţională cu numărul de particule care se găsesc dizolvate într-un volum determi-

nat de soluţii, fiind independentă atât de natura dizolvantului, cât şi acea a solvitului.

Deoarece substanţele dizolvate se comportă în soluţii ca şi cum s-ar afla în stare gazoasă, prin analogie cu aceasta şi conform legii lui Avogadro, se poate spune că: două volume egale de soluţii diferite, având aceeaşi presiune osmotică şi aceeaşi temperatură, vor conţine acelaşi număr de particule care pot fi molecule sau ioni, Invers se poate spune că soluţiile molare de electroliţi şi neelectroliţi care conţin acelaşi număr de particule (molecule sau ioni), au aceeaşi presiune osmotică. Astfel de soluţii poartă denumirea de "soluţii izotonice", ele putând avea aceeaşi molaritate sau molarităţi diferite. Astfel o soluţie de KCl ce cuprinde o moleculă gram KCl %o este izotonică cu o soluţie care cuprinde o moleculă gram NaCl %o (ambele soluţii având acelaşi număr de particule:

$$NaCl \longrightarrow Na^+ + Cl^-; \quad KCl \longrightarrow K^+ + Cl^-$$

Prepararea soluţiilor de fosfaţi alcalini, izotonice cu plasmă sanguină

O soluţie de NaCl izotonică cu plasma sanguină, conţine 8,6 g NaCl %o. Pentru a prepara diverse soluţii izotonice cu plasma sanguină, se calculează mai întâi soluţia de fosfaţi izotonică cu o soluţie molară de NaCl şi după aflarea raportului de molaritate, se calculează cantitatea de fosfaţi corespunzătoare la 8,6 g %o NaCl. Pentru prepararea soluţiei izotonice de fosfaţi, se disting trei cazuri după natura fosfatului:

a) soluţie de fosfat monosodic (NaH_2PO_4) izotonică cu o soluţie molară de NaCl cuprinde o moleculă gram NaH_2PO_4 %o deoarece ambele soluţii dau câte două particule în soluţie:

$$NaCl \longrightarrow Na^+ + Cl^-$$

$$NaH_2PO_4 \longrightarrow Na^+ + H_2PO_4^-$$

Deci, soluţia molară de NaCl este izotonică cu soluţia molară de NaH_2PO_4.

Se calculează cantitatea de NaH_2PO_4 corespunzătoare la 8,6 g NaCl%o (soluţie izotonică cu serul sanguin)

1 mol NaCl . . . . . 1 mol $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$

58,45 138,01

8,6 X

$$X = \frac{8,6 \times 138,01}{58,45} = 20,306 \text{ g}$$

reprezintă cantitatea de NaH_2PO_4 ce se va dizolva într-un balon cotat de 1000 ml, completându-se apoi cu apă distilată la semn.

b) o soluţie de fosfat disodic (Na_2HPO_4) izotonică cu soluţia molară de NaCl, cuprinde 2/3 mol g Na_2HPO_4 %o, deoarece Na_2HPO_4 dă trei particule , iar NaCl dă două particule:

$$NaCl \longrightarrow Na^+ + Cl^-$$
$$Na_2HPO_4 \longrightarrow 2Na^+ + HPO_4^{2-}$$

Cel mai mic multiplu comun între 3 şi 2 este 6. Deci va trebui să se ia 6 : 2 = 3 mol g NaCl %o.

Deci soluţia Na_2HPO_4 este izotonică cu soluţia NaCl 3 M.

Dacă 3 mol g NaCl . . . . . 2 mol $Na_2HPO_4.12H_2O$
3 x 58,45 . . . . . 2 x 358,18
8,6 X

$$X = \frac{358,18 \times 8,6 \times 2}{3 \times 58,45} = 35,134 \text{ g}$$

reprezintă cantitatea de Na_2HPO_4 ce se va dizolva în apă distilată într-un balon cotat de 1000 ml completându-se la semn după dizolvare.

c) o soluţie de fosfat trisodic (Na_3PO_4) izotonică cu NaCl cuprinde 1/2 mol g Na_3PO_4 %o deoarece Na_3PO_4 dă patru particule iar NaCl dă două particule:

$$NaCl \longrightarrow Na^+ + Cl^-$$
$$Na_3PO_4 \longrightarrow 3Na^+ + PO_4^{3-}$$

cel mai mic multiplu comun între 4 şi 2 este 4. Deci, va trebui să se ia 4:4 = 1 mol g Na_3PO_4 %o pentru 4:2 = 2 mol g NaCl %o.

Putem spune că o soluţie Na_3PO_4 1 M este izotonică cu o soluţie de NaCl 2 M. Atunci vom avea:

2 mol NaCl . . . . . 1 ml $Na_3PO_4.12H_2O$
2 x 58,45 380,17
8,6 X

$$X = \frac{8,6 \times 380,17}{2 \times 58,45} = 2,982 \text{ g}$$

reprezintă cantitatea de Na_3PO_4 ce se dizolvă într-un balon cotat de 1000 ml, completându-se la semn cu apă distilată.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru fiecare caz se calculează cantitatea necesară pentru a prepara o cantitate dorită, de exemplu: să preparăm 1bo ml soluţie izotonică de Na_2HPO_4:

Dacă pentru 1ooo ml . . . . . 2o,3o g Na_2HPO_4
1oo . . . . . y

$$y = \frac{1oo \times 2o,3o}{1ooo} = 2,o3 \text{ g}$$

care reprezintă cantitatea de Na_2HPO_4 se se vor dizolva într-un balon de 1oo ml.

Soluţiilor izotonice astfel preparate li se poate verifica concentraţia făcându-se dozarea fosfatului după caz, fie acidimetric fie alcalimetric.

Prepararea soluţiei de glucoză izotonică
cu plasma sanguină

O soluţie de glucoză izotonică cu NaCl 1 M va cuprinde 2 mol gram glucoză %o, deoarece glucoza nefiind electrolit, o moleculă gram dă o singură particulă (moleculă de glucoză), pe când NaCl dă 2 particule (ionii Cl^- şi Na^+).

Deci, raportul de molaritate este de 2 mol g glucoză, pentru 1 mol g de NaCl. Cantitatea de glucoză corespunzătoare la 8,6 g %o NaCl va fi:

1 mol g NaCl . . . . . 2 mol g glucoză
58,45 . . . . . 2 x 18o,16
8,6 x

$$x = \frac{8,6 \times 2 \times 18o,16}{58,45} = 53,o15 \text{ g glucoză}$$ pentru 1ooo ml soluţie.

3. Concentraţia normală sau normalitatea sau concentraţia echivalentă, reprezintă numărul de echivalenţi gram (vali) de substanţă dizolvată la 1ooo ml soluţie. Se notează cu "n" sau cu "N". O soluţie normală (N) conţine un echivalent gram (1 val) de substanţă dizolvată la 1 litru de soluţie.

Echivalentul-gram (val), reprezintă cantitatea dintr-un element, exprimată în grame, care se combină cu un atom gram de hidrogen (1,oo8 g) sau cu jumătate dintr-un atom gram de oxigen (8 g), sau care poate înlocui aceste cantităţi de hidrogen sau oxigen din combinaţiile lor.

In reacţiile de neutralizare (reacţii cu schimb de protoni)

echivalentul gram se defineşte ca fiind cantitatea de substanţă care reacţionează cu un echivalent gram de protoni (egal cu 1 ion-gram de hidrogen) în reacţia respectivă. In reacţiile de oxido-reducere prin echivalent gram se înţelege cantitatea de substanţă care reacţionează cu un electron gram ($5,49.10^{-4}$) în reacţia respectivă. In calcularea echivalentului trebuie să ţinem seama de reacţia chimică ce are loc, în caz contrar calcularea greşită a echivalentului gram poate duce la erori foarte mari ale rezultatului analizei.

Cantităţile de substanţă care reacţionează sau se înlocuiesc într-un proces chimic sunt echivalente între ele.

Echivalentul gram al unui element, va fi dat de raportul dintre masa lui atomică şi numărul valenţelor, ca de exemplu:

$$E_{Na} = \frac{22,991}{1} = 22,991$$

$$E_{Ca} = \frac{40,08}{2} = 20,04$$

Echivalentul gram al fosforului în reacţia: $P_4 + 6Cl_2 \rightarrow 4PCl_3$

$E_P = 30,93/3$ sau în reacţia $P_4 + 10Cl_2 \longrightarrow 4PCl_5$

$E_P = 30,93/5$

Echivalentul gram al acizilor, va fi dat de raportul dintre masa moleculară respectivă şi numărul de hidrogeni activi (care pot fi înlocuiţi prin metale) ca de exemplu:

$$E_{HCl} = \frac{36,465}{1} = 36,465 \text{ g HCl}$$

$$E_{H_2SO_4} = \frac{98,076}{2} = 49,038 \text{ g } H_2SO_4$$

Pentru H_3PO_4, echivalentul gram este identic cu molecula gram în reacţia $H_3PO_4 + NaOH \longrightarrow NaH_2PO_4 + H_2O$. E = 97,998 deoarece numai unul din ionii de hidrogen ai acidului fosforic participă la reacţie.

In reacţia: $H_3PO_4 + 2NaOH \longrightarrow Na_2HPO_4 + H_2O$ participă deci ioni de hidrogen ai acidului fosforic, deci echivalentul gram este: $\frac{97,998}{2} = 48,999$ g.

Echivalentul gram al bazelor, se calculează împărţind molecula gram la numărul de oxidrili care iau parte la reacţia respectivă. Exemplu: $E_{NaOH} = \frac{40,005}{1} = 40,0005$ g;

$$E_{Ca(OH)_2} = \frac{74,096}{2} = 37,048$$

Echivalentul gram la săruri se calculează împărţind molecula gram (ţinând cont şi de cantitatea de apă de cristalizare) la

produsul dintre numărul de cationi din moleculă şi valenţa lor, ca de exemplu:

$$E_{FeCl_3 \cdot 6H_2O} = \frac{270,315}{1 \times 3} = 90,105\ g$$

$$E_{Fe_2(SO_4)_3} = \frac{399,9}{6} = 66,66\ g$$

Echivalentul gram al oxidanţilor sau reducătorilor este dat de raportul dintre molecula gram respectivă şi numărul de electroni schimbaţi (câştigaţi de oxidant, sau pierduţi de reducător). De exemplu, anionul MnO_4^- în care Mn este heptavalent reacţionează diferit în funcţie de mediul în care are loc reacţia. Astfel, în mediu puternic acid (H_2SO_4) Mn^{7+} primeşte 5 e^- trecând în Mn^{2+} conform reacţiei:

$$MnO_4^- + 5\ e^- + 8\ H^+ \rightleftharpoons Mn^{2+} + 4\ H_2O;\ GM_{KMnO_4} = 158,03$$

echivalentul gram $KMnO_4 = \frac{158,03}{5} = 31,606\ g$

In mediu slab acid sau neutru are loc reacţia:

$$MnO_4^- + 3\ e^- + 4\ H^+ \longrightarrow MnO_2 + 2\ H_2O$$

echivalentul gram $KMnO_4 = \frac{158,63}{3} = 52,67\ g$

In mediu puternic alcalin, permandanatul reacţionează cu un singur electron conform reacţiei:

$$MnO_4^- + e^- \rightleftharpoons MnO_4^{2-}$$

echivalentul gram $KMnO_4 = \frac{158,03}{1} = 158,03\ g$

Totdeauna numărul de echivalenţi gram al uneia dintre substanţele care reacţionează, este egal cu al celeilalte substanţe. Deci, substanţele reacţionează între ele de la echivalent la echivalent.

Cunoscând concentraţia procentuală, putem calcula concentraţia în echivalenţi gram (vali/litru):

$$C(vali/litru) = \frac{conc.\% \times 10}{echiv.gram}$$

Din relaţiile amintite se deduce şi operaţia inversă de calcul a concentraţiei procentuale pornind de la concentraţia normală sau molară. Astfel:

$$C\ \% = \frac{Conc.normală \times echiv.gram}{10}, \text{ respectiv}$$

$$C\ \% = \frac{Conc.molară \times molecula\ gram}{10}$$

In locul concentraţiei molare, se lucrează în biochimie cu concentraţii milimolare (mM), micromolare (uM) sau miliechivalenţi gram.

$$C(mM) = \frac{mg\ substanţă/litru}{moleculă\ gram}$$

$$C(uM) = \frac{ug\ substanţă/litru}{moleculă\ gram}$$

$$C(mEg) = \frac{mg\ substanţă/litru}{Echivalent\ gram}$$

Prepararea unei soluţii de normalitate inferioară dintr-o soluţie de normalitate superioară

In general se prepară soluţii mai concentrate şi în momentul utilizării, se diluiază la concentraţia dorită. De exemplu dacă vrem să preparăm o soluţie o,ol N dintr-o soluţie o,l N, facem mai întâi raportul normalităţilor, aflând astfel diluţia: o,l/o,ol =lo. Dacă dorim să preparăm looo ml soluţie o,ol N, împărţim volumul de looo ml la diluţie, looo/lo = loo ml. Această cantitate din soluţia o,l N se va introduce într-un balon cotat şi se va completa la looo ml cu apă distilată, obţinându-se astfel looo ml soluţie o,ol N.

Titru, factor de normalitate

Titrul unei soluţii reprezintă cantitatea de substanţă, exprimată în grame, care se găseşte dizolvată într-un mililitru de soluţie. Se notează cu T.

In analizele de laborator, se utilizează două feluri de soluţii:

1. Soluţii etalon sau titrimetrice a căror concentraţii pot fi calculate teoretic. Pentru ca o substanţă să poată fi folosită la prepararea unei soluţii etalon, trebuie să îndeplinească anumite condiţii: să fie foarte pură, să fie stabilă în condiţii de lucru (să nu se carbonateze, să nu se oxideze, să nu absoarbă apă sau să nu piardă apa de cristalizare) să fie stabilă în dizolvantul în care se utilizează, să se poată obţine uşor în gradul de puritate necesar.

Dintre substanţele folosite pentru prepararea soluţiilor etalon cităm: acidul oxalic $(COOH)_2.2H_2O$; Na_2CO_3 anhidru, $NaCl$, $K_2Cr_2O_7$ etc.

Soluţiilor etalon sau titrimetriee, le corespunde titru teoretic T_t. Titru teoretic se poate afla, cunoscând normalitatea soluţiei. De exemplu: să se afle titrul teoretic al soluţiei o,l N de $NaCl$. Vom raţiona astfel:

Dacă la 1000 ml soluţie se află E_g x N (58,01)
atunci la 1 ml . . . . . T_t

$$T_t = \frac{Eg \times N \ (58 \times 0,1)}{1000} = g/ml$$

2. Soluţii titrate care, prin preparare nu corespund calculului teoretic, concentraţia lor trebuie să fie stabilită printr-o determinare practică (titrare). Soluţiilor titrate, pe baza unei soluţii etalon, le corespunde Titrul real (Tr).

Pentru a determina titrul real, se poate lucra în două moduri:

a) Se cântăresc cu exactitate, la balanţa analitică "a" grame (în jurul 0,15-0,2 pentru sol.0,1 N) substanţa etalon. Se dizolvă în apă şi se titrează cu soluţia de titru necunoscut în prezenţa unui anumit indicator, până la punctul de echivalenţă, se citeşte volumul de soluţie consumat la titrare. Se repetă titrarea cel puţin încă o dată (cu cât numărul determinărilor este mai mare, cu atât titrul se va stabili mai exact).

Dacă s-au cântărit "a" g substanţă etalon a cărei Eg etalon este egal cu Eg, pentru această cantitate de "a" grame substanţă s-au consumat "n" ml soluţie a cărei titru vrem să-l aflăm (Tx=Tr) care are echivalentul gram Ex dat şi ţinând seama că soluţiile se titrează echivalent la echivalent, vom raţiona:

Eg etalon . . . . . Ex
a g . . . . . n Tx

$$Tx_{real} = \frac{a}{n} \cdot \frac{Ex}{E\ et.}$$

b) Se prepară o soluţie etalon de normalitate precisă şi din această soluţie, se iau volume cunoscute care se titrează cu soluţia a cărui titru vrem să-l stabilim.

Considerăm că am luat n_1= ml soluţie etalon, E_{et}= echivalentul gram al substanţei etalon; T_t = titrul teoretic al soluţiei etalon (g/ml), n_2 = ml soluţie de cercetat; T_r(titrul real) = titrul soluţiei de analizat ce trebuie stabilit, se face calculul tot pe baza legii echivalenţii:

E_{et} . . . . . E_x
$n_1 T_{t(et)}$ . . . . . $n_2 T_r$

$$T_r = \frac{n_1}{n_2} \cdot \frac{T_{t(et)} \cdot E_x}{E_{et}}$$; înlocuind T_t prin valoarea lui:

$$T_{t(et)} = \frac{E_{et} \cdot N_{et}}{1000}$$

$$T_r = \frac{n_1}{n_2} \cdot \frac{\frac{E_{et} \cdot N_{et}}{1000} \cdot E_x}{E_{et}} = \frac{n_1}{n_2} \cdot \frac{E_x}{10000} \cdot N_{et}$$

Deci:

$$T_r = \frac{n_1}{n_2} \cdot \frac{E_x}{1000} \cdot N_{et}$$

Factorul de neutralitate

In cazul când soluţiile preparate nu au o normalitate exactă acestea se pot transforma prin calcul în soluţii de normalitate exactă, utilizând un factor (f) de corecţie. Factorul indică volume de soluţie de normalitate exactă care corespunde la 1 ml soluţie de normalitate aproximativă. Factorul permite să se transforme un volum dat dintr-o soluţie aproximativ normală, în volumul echivalent de soluţie cu normalitate exactă.

f x n ml aprox. = n ml precis

Factorul de corecţie se determină făcându-se raportul dintre volumul soluţiei de normalitate exactă (precis) şi volumul corespunzător de soluţie de normalitate aproximativă:

$$F = \frac{n_1 \text{ precis}}{n_2 \text{ aprox.}}$$

Factorul se mai poate calcula, dacă se cunoaşte titrul soluţiei sau normalitatea:

$$F = \frac{T_{real}}{T_{teoretic}} = \frac{N_{reală}}{N_{teoretic}}$$

Factorul serveşte şi la aducerea unei soluţii la normalitate precisă, cu condiţia ca factorul să fie mai mare decât unitatea. Se poate calcula câţi ml din soluţia de factor mai mare ca 1 trebuie luaţi pentru ca prin completare cu apă, să obţinem o normalitate precisă (F = 1).

Să considerăm că vrem să preparăm V ml soluţie de normalitate N precis, dintr-o alta a cărui factor este mai mare ca 1. Pentru aceasta plecăm de la definiţia factorului:

$$F = V_{precis} / V_{aprox.} \; ; \; V_{aprox.} = V_{precis}/F$$

Exemplu: să se prepare 200 ml soluţie NaOH de normalitate

o,1 N dintr-o soluţie aproximativ o,1 N cu factor 1,2.

$V_{aprox.}$ = 2oo/1,2 = 166,66 ml din soluţia de factor 1,2, şi completăm cu apă distilată la 2oo ml. Obţinem astfel o soluţie exact o,1 N.

Indicatori de titrare

Indicatorii sunt substanţe folosite în evidenţierea punctului de echivalenţă a reacţiilor, prin modificarea proprietăţilor lor. Distingem:

- indicatori de pH sau acido-bazici la care modificarea comportamentului este o consecinţă a concentraţiei H^+ sau OH^- deci este dependentă de pH-ul soluţiilor;
- indicatori redox a căror modificare este determinată de variaţia potenţialului redox - de oxido-reducere a soluţiilor -.

La rândul lor indicatorii de pH sunt: de culoare, fluorescenţă, absorbţie şi turbidimetrici.

Indicatorii acido-bazici sunt mai utilizaţi în laborator. Schimbarea de culoare se datoreşte modificării structurii indicatorului, concomitent cu modificarea gradului său de disociaţie.

Considerând un indicator care este un acid slab disociat în soluţie apoasă:

$$HI \rightleftharpoons H^+ + I^-$$

Constanta de disociere este:

$$K_{HI} \frac{(I^-)(H^+)}{(HI)} \quad \text{deci} \quad \frac{K_{HI}}{(H^+)} = \frac{(I^-)}{(HI)}$$

Evident, culoarea soluţiei de indicator depinde de raportul $\frac{(I^-)}{(HI)}$, care la rândul său depinde de (H^+).

In cazul în care indicatorul este o bază slabă (IOH) vom avea:

$$IOH \rightleftharpoons I^+ + OH^- \; ; \; K_{IOH} = \frac{(I^+)(OH^-)}{(IOH)} \quad \text{deci}$$

$$\frac{K_{IOH}}{(OH^-)} = \frac{(I^+)}{(IOH)}$$

Deci în acest caz culoarea va depinde de raportul $\frac{(I^+)}{(IOH)}$ care la rândul său depinde de (OH^-).

Intervalul de pH în care indicatorul îşi schimbă culoarea, corespunde domeniului de viraj al indicatorului.

Cu cât un indicator are un interval de viraj mai restrâns, cu atât punctul de viraj al indicatorului va fi mai sensibil. Există indicatori a căror domeniu de viraj acoperă întreaga scară de pH de la o - 14. Aceştia se numesc universali.

Alegerea indicatorului se face în funcţie de pH-ul la care este atins punctul de echivalenţă. Acest lucru depinde de natura acizilor şi bazelor care reacţionează între ele.

Astfel: a) In cazul titrării acizilor slabi cu baze tari, se formează o sare care, ca electrolit tare disociază şi sub efectul apei, suferă un fenomen de hidroliză cu caracter bazic:

$$CH_3COOH + NaOH \rightleftharpoons CH_3COO^- Na^+ + H_2O$$

Sarea rezultată suferă hidroliză bazică:

$$CH_3COO^-Na^+ + H_2O \longrightarrow \underset{\text{parţial disociat}}{CH_3COOH} + \underset{\text{total disociat}}{Na^+ + OH^-}$$

predomină OH^- care conferă un caracter bazic soluţiei. In acest caz se utilizează un indicator al cărui domeniu de viraj este în mediu alcalin, exemplu fenolftaleina (pH=8,5-10).

b) In cazul titrării bazelor slabe cu acizi tari, fenomenul de hidroliză pe care îl suferă sarea formată în mediu apos, va fi cu caracter acid:

$$NH_4OH + HCl \longrightarrow NH_4Cl + H_2O$$

$$NH_4Cl + HOH \longrightarrow H^+Cl^- + NH_4OH$$

Reacţia mediului va fi imprimată de H^+ care conferă caracter acid soluţiei. In acest caz va fi utilizat un indicator cu domeniu de viraj în mediu acid ca roşu de metil (pH = 4,2 - 6,3).

c) In cazul titrării acizilor slabi cu baze slabe şi invers sarea care rezultă suferă un fenomen de hidroliză cu caracter aproape neutru ca urmare a faptului că substanţele rezultate sunt numai parţial disociate.

$$NH_4OH + CH_3COOH \rightleftharpoons CH_3COONH_4 + H_2O$$

$$CH_3COONH_4 + HOH \rightleftharpoons CH_3COOH + NH_4OH$$

NH_4OH şi CH_3COOH sunt electroliţi numai parţial disociaţi, de tărie aproape identică. In consecinţă, caracterul soluţiei va rămâne neutru.

Se utilizează ca indicator, albastru de brom timol (pH=6-8).

d) In cazul titrării acizilor tari cu baze tari şi invers nu se poate vorbi de existenţa în soluţie a unor molecule de sare

formată ca fiind nedisociate, în consecinţă reacţia mediului este neutră, concentraţia H^+ şi OH^- fiind egală:

$$H^+Cl^- + Na^+OH^- \rightleftharpoons Na^+Cl^- + H_2O$$

$$Na^+Cl^- + HOH \rightleftharpoons Na^+OH^- + H^+Cl^-$$

Pot fi utilizaţi ori care din indicatorii menţionaţi în cazurile discutate.

Condiţiile pe care trebuie să le îndeplinească un indicator de pH sunt următoarele:

a) Schimbarea de culoare să fie reversibilă, adică indicatorul să funcţioneze reversibil.

b) Schimbarea de culoare să se producă brusc, deci într-un interval de pH cât mai mic.

c) Indicatorul să fie solubil în apă pentru ca soluţia să fie suficient de colorată.

d) Indicatorul să aibă putere de colorare, chiar pentru concentraţii mici de indicatori, culoarea trebuie să fie uşor observabilă.

e) Schimbarea de culoare să se producă la adaosul unor concentraţii mici de acid sau de bază.

f) Indicatorul să fie stabil în concentraţiile obişnuite de lucru: apa, lumina, oxigenul, CO_2 să nu îl altereze.

Intervalul de pH în care indicatorul îşi schimbă culoarea, corespunde domeniului de viraj al indicatorului.

Cu cât un indicator are un interval de viraj mai restrâns, cu atât punctul de viraj al indicatorului va fi mai sensibil.

Dintre indicatorii redox, $KMnO_4$ poate servi nu numai ca reactiv ci şi ca indicator în baza reducerii Mn^{7+} în mediu acid la Mn^{2+}.

VOLUMETRIA

Principiul care stă la baza tuturor metodelor volumetrice, constă în măsurarea volumului de soluţie de concentraţie cunoscută (soluţie - reactiv), întrebuinţat la efectuarea reacţiei cantitative cu substanţa cercetată.

Intrucât totdeauna cantitatea de reactiv ce reacţionează cantitativ cu substanţa cercetată este echivalentă cu aceasta, în analiza volumetrică, la soluţia cercetată se adaugă o cantitate de

reactiv exactă, până la proporţia stoechiometrică, conform reacţiei chimice ce stă la baza metodei utilizate; de aceea reactivul trebuie să aibă o concentraţie strict determinată. Momentul în care substanţa supusă analizei a reacţionat cantitativ cu reactivul se numeşte moment sau punct de echivalenţă.

Procesul de adăugare treptată a reactivului până la punctul de echivalenţă se numeşte titrare.

Sfârşitul reacţiei şi deci punctul de echivalenţă se poate pune în evidenţă după metoda folosită în analiză şi anume:

- In metodele volumetrice pur chimice, sfârşitul reacţiei este pus în evidenţă cu ajutorul indicatorilor, al căror transformări în jurul punctului de echivalenţă sunt însoţite de schimbări vizibile ca: schimbarea de culoare (viraj), separarea de precipitat etc.

- In metodele volumetrice fizico-chimice se foloseşte o proprietate fizico-chimică a soluţiilor ce se determină în tot timpul titrării ca de exemplu: sfârşitul reacţiei poate fi pus în evidenţă prin variaţia bruscă în vecinătatea punctului de echivalenţă a conductibilităţii soluţiei (conductometrie), fie prin variaţia bruscă a potenţialului electric dintre soluţie şi un electrod de referinţă (potenţiometrie) sau variaţia indicelui de refracţie etc.

Clasificarea metodelor de analiză volumetrică chimică

După tipul reacţiei care stă la baza titrării, metodele volumetrice se pot împărţi în:

- Metode prin reacţii de protoliză (neutralizare).
- Metode prin reacţii de oxido-reducere (redoxometrie), care în funcţie de sistemul redox care se utilizează, se clasifică în permanganometrie, iodometrie, bicromatometrie, etc.
- Metode prin reacţii cu formare de precipitate.
- Metode prin reacţii cu formare de combinaţii puţin disociate.
- Metode prin reacţii cu formare de combinaţii complexe.
- Metode fizico-chimice, conductometrie, potenţiometrie.

ACIDIMETRIA

Acidimetria cuprinde metode de dozare a acizilor tari şi slabi şi a sărurilor cu hidroliză acidă. Pentru dozare se folosesc

soluţii de bază cu concentraţii cunoscute.

Prepararea şi titrarea NaOH aproximativ 0,1 N

Deoarece NaOH nu este substanţă stabilă nu se poate prepara o soluţie de normalitate exactă prin cântărire. Se va stabili titrul şi factorul soluţiei de NaOH cu ajutorul unei soluţii etalon de acid oxalic.

Echivalentul gram al NaOH este 40,005, deci pentru a prepara o soluţie 0,1 N se vor cântări 4,0005 g NaOH pentru 1000 ml soluţie.

Datorită faptului că NaOH se carbonatează, stratul de carbonat se îndepărtează înainte de prepararea soluţiei. Pentru aceasta se cântăreşte la balanţa tehnică o cantitate ceva mai mare (aproximativ 5 g NaOH) decât cea rezultată în urma calculului, se va trece într-un pahar şi se va spăla foarte repede de 3-4 ori cu apă distilată, după care se dizolvă şi se aduce într-un balon cotat de 1000 ml. Se completează cu apă distilată la semn.

Prepararea soluţiei etalon de acid oxalic

Echivalentul acidului oxalic în reacţia de neutralizare este 126,068/2 = 63,034. Pentru a prepara o soluţie 0,1 N se cântăreşte la balanţa analitică 6,3034 g acid oxalic, se aduce cantitativ într-un balon cotat de 1000 ml şi se completează la semn cu apă distilată.

Titrarea soluţiei de NaOH

Principiu

Se neutralizează o cantitate cunoscută de acid oxalic 0,1 N cu NaOH în prezenţa fenolftaleinei ca indicator până la viraj slab roz.

$$(COOH)_2 + 2\ NaOH \longrightarrow (COONa)_2 + 2\ H_2O$$

Reactivi

1. Acid oxalic 0,1 N
2. NaOH 0,1 N
3. Sol. fenolftaleină, indicator, 1 % în alcool 70°.

Mod de lucru

Intr-un balon Erlenmayer de 100 ml se pipetează 10 ml soluţie etalon de acid oxalic, se încălzeşte la 60-70° C (preferabil pe baie de apă) pentru îndepărtarea CO_2 liber din soluţie. Trebuie evitată încălzirea prea puternică a soluţiei pentru a nu se descompune acidul oxalic.

Se adaugă 3-4 picături fenolftaleină şi se titrează cu NaOH din biuretă până la viraj slab roz persistent. Se repetă operaţia făcându-se media a trei determinări.

Se notează n_1 = ml soluţie acid oxalic şi n_2 = ml soluţie NaOH utilizaţi la titrare:

$$T_{NaOH} = \frac{n_1}{n_2} \times \frac{40,005 \times 0,1}{1000}$$

ALCALIMETRIE

In alcalimetrie se dozează bazele tari şi slabe, precum şi sărurile cu hidroliză alcalină cu acizi de concentraţie cunoscută.

Prepararea şi titrarea soluţiei de HCl 0,1 N

Acidul clorhidric concentrat conţine 37 g % HCl gazos; d=1,19. Echivalentul gram al HCl este egal cu masa lui moleculară (36,47).

Pentru prepararea unei soluţii 0,1 N ar trebui să se cântărească 3,647 g HCl la 1000 ml soluţie. Se calculează ml HCl concentrat care conţin 3,647 g HCl gazos:

100 g HCl conc. . . . . 37 g HCl gazos
x . . . . . 3,647 g HCl gazos

$$x = \frac{3,647 \times 100}{37} = 9,85 \text{ g HCl conc.}$$

Stiind că G = V x d, calculăm volumul de acid clorhidric conc. care conţine 9,85 g HCl conc.

$$V = \frac{G}{V} = \frac{9,85}{1,19} = 8,28 \text{ ml HCl conc.}$$

Acest volum de 8,28 ml HCl se introduce într-un balon cotat de 1000 ml în care se află aproximativ 200 ml apă distilată, după care se completează la semn cu apă distilată.

Titrul soluţiei de HCl se stabileşte cu soluţie etalon de carbonat de sodiu.

Prepararea soluției etalon de Na_2CO_3 0,1 N

Echivalentul gram a Na_2CO_3 anhidru este 105,988/2 = 52,994.

Pentru prepararea soluției 0,1 N se cântărește la balanța analitică 5,2994 g Na_2CO_3 anhidru, se aduce cantitativ într-un balon cotat de 1000 ml și se completează la semn cu apă distilată.

Titrarea soluției de HCl 0,1 N

Principiu

Acidul clorhidric este neutralizat de Na_2CO_3 conform reacției:

$$2\ HCl + Na_2CO_3 \longrightarrow 2\ NaCl + CO_2 + H_2O$$

Reactivi

1. Sol. acid clorhidric 0,1 N
2. Sol. carbonat de sodiu anhidru 0,1 N
3. Sol. metil orange, indicator, 0,1 % sol. apoasă.

Modul de lucru

Într-un balon Erlenmeyer de 100 ml se pipetează 10 ml (n_1) soluție Na_2CO_3, se adaugă 2-3 picături metil orange și se titrează cu HCl din biuretă până la virajul indicatorului de la galben la portocaliu. Se îndepărtează CO_2 prin fierbere timp de 2 minute, se răcește și dacă soluția devine din nou galbenă, se titrează până la portocaliu (n_2 = ml HCl 0,1 N utilizați în total la titrare). Se repetă de 2-3 ori operația, făcându-se media determinărilor.

$$T_{HCl} = \frac{n_1}{n_2} \times \frac{36,47 \times 0,1}{1000}$$

În cazul când soluția de HCl este mai concentrată decât 0,1 N se poate aduce la normalitate exactă prin diluție. De exemplu:

Dacă prin titrare am consumat 9,5 ml soluție HCl, deci soluția noastră de HCl este mai concentrată, se va adăuga apă după următorul calcul:

10 ml HCl . . . . . 0,5 ml apă

1000 ml HCl x

$$X = \frac{1000 \times 0,5}{10} = 50 \text{ ml apă distilată}$$

Într-un balon cotat de 1000 ml se introduc 50 ml apă distilată și se completează la semn cu soluție de HCl aproximativ 0,1 N. Se verifică titrul soluției corectate.

In cazul când soluţia nu a fost adusă la normalitate exactă se utilizează factorul de corecţie.

PERMANGANOMETRIA

Cuprinde metode de dozare a diferiţilor reducători cu $KMnO_4$.

PREPARAREA ŞI TITRAREA SOLUTIEI DE $KMnO_4$ 0,1 N

In mediu puternic acid, echivalentul gram al $KMnO_4$ este 158,03/5 = 31,606 g.

Pentru prepararea soluţiei 0,1 N se va cântări aproximativ 3,2 g $KMnO_4$, care se dizolvă în 1000 ml apă distilată. Se ţine apoi soluţia pe o baie de apă la fierbere aproximativ 1 oră pentru oxidarea eventualelor substanţe organice. După răcire se filtrează pentru îndepărtarea MnO_2 format în urma reducerii $KMnO_4$. Soluţia se păstrează în sticlă brună.

Determinarea titrului soluţiei de $KMnO_4$ se face cu acid oxalic, oxalat de sodiu sau trioxid de arsen.

Titrarea soluţiei de $KMnO_4$ 0,1 N

Principiu

$KMnO_4$ în mediu acid oxidează acidul oxalic la CO_2, el reducându-se la cation manganos:

$$2\ KMnO_4 + 5\ H_2C_2O_4 + 3\ H_2SO_4 = 2\ MnSO_4 + 10\ CO_2 + K_2SO_4 + 8\ H_2O$$

$$Mn^{7+} + 5\ e^- \longrightarrow Mn^{2+}$$

$$C_2O_4^{2-} - 2\ e^- \longrightarrow 2\ CO_2$$

Reactivi

1. Sol.etalon acid oxalic 0,1 N
2. Acid sulfuric 25 %
3. Sol. permanganat de potasiu 0,1 N

Modul de lucru

Intr-un balon Erlenmeyer de 100 ml se pipetează 10 ml soluţie acid oxalic 0,1 N (n_1), se adaugă 5 ml acid sulfuric 25 %, se încălzeşte la 75 - 80°C pe baie de apă şi se titrează cu $KMnO_4$ până la apariţia culorii roz. La început culoarea $KMnO_4$ dispare lent, deoarece viteza de reacţie este mai mică, apoi când în soluţie apar ionii Mn^{2+}, sub acţiunea catalitică a acestora, decolorarea are loc imediat. Titrarea se va face sub agitare mai puternică la început şi nu

se va adăuga o nouă picătură de permanganat până ce culoarea roz nu dispare complet. Se continuă titrarea până când culoarea roz nu mai dispare. In acest moment reacţia este terminată. Se notează numărul de ml de $KMnO_4$ consumaţi cu n_2.

$$T_{KMnO_4} = \frac{n_1}{n_2} \times \frac{31,606 \times 0,1}{1000}$$

IODOMETRIA

Iodometria cuprinde metode de dozare a reducătorilor cu o soluţie de iod, precum şi metode de dozare a oxidanţilor care acţionând asupra anionului I^-, pun în libertate iod elementar, ce este titrat apoi cu o soluţie de tiosulfat de sodiu. Iodul elementar este un oxidant care acţionează după reacţia:

$$I_2 + 2\,e^- \rightleftharpoons 2\,I^-$$

Deoarece solubilitatea iodului în apă este foarte mică se lucrează cu o soluţie apoasă de iodură alcalină (KI) când se formează I_3^- (I_2I^-), dând complexul KI_3; atunci reacţia de mai sus devine:

$$I_3^- + 2\,e^- \rightleftharpoons 3\,I^-$$

Unul din indicatorii folosiţi este soluţia de amidon, care cu I_2 dă complexul (amidon I_2). KI de culoare albastră.

PREPARAREA SI TITRAREA SOLUTIEI DE $Na_2S_2O_3$ 0,1 N

Echivalentul gram al $Na_2S_2O_3 \cdot 5\,H_2O$ este 248,19/1 = 248,19 g.

Pentru prepararea soluţiei 0,1 N se cântăresc 25 g tiosulfat de sodiu, care se dizolvă într-un balon cotat de 1000 ml cu apă distilată fiartă şi răcită, lipsită de CO_2. In aceste condiţii soluţia îşi va păstra titrul un timp mai îndelungat. Se va păstra în sticlă brună, la adăpost de CO_2 şi aer, care schimbă titrul soluţiei.

Determinarea titrului soluţiei de tiosulfat de sodiu se face cu substanţe etalon oxidante: bicromat de potasiu, iodat de potasiu sau o soluţie de permanganat de potasiu de titru cunoscut.

Prepararea soluţiei etalon de $K_2Cr_2O_7$ 0,1 N

Echivalentul gram al $K_2Cr_2O_7$ este egal cu 294,192/6 =49,032.

Pentru prepararea soluţiei 0,1 N, se cântăreşte la balanţa analitică 4,9032 g $K_2Cr_2O_7$ p.a., se aduce cantitativ într-un balon

cotat de 1000 ml şi se completează la semn cu apă distilată.

Titrarea soluţiei de tiosulfat de Na 0,1 N

Principiu

Bicromatul de potasiu în mediu puternic acid, descompune iodura de potasiu punând în libertate o cantitate de iod echivalentă cu cantitatea de bicromat luată în lucru. Iodul se titrează cu tiosulfat de sodiu în prezenţa amidonului ca indicator.

$$K_2Cr_2O_7 + 6KI + 7H_2SO_4 = 3I_2 + Cr_2(SO_4)_3 + 4\,K_2SO_4 + 7\,H_2O$$

$$Cr_2O_7^{2-} + 6\,e^- \longrightarrow 2\,Cr^{3+}$$

$$6\,I^- - 6\,e^- \longrightarrow 3\,I_2^0$$

$$I_2 + 2\,Na_2S_2O_3 = 2\,NaI + Na_2S_4O_6$$

$$2\,S_2O_3^{2-} - 2\,e^- \longrightarrow S_4O_6^{2-}$$

$$I_2^0 + 2\,e^- \longrightarrow 2\,I^-$$

Reactivi

1. Sol.bicromat de potasiu 0,1 N
2. Sol.tiosulfat de sodiu 0,1 N
3. Sol.acid sulfuric 25 %
4. Sol. iodură de potasiu 10 %
5. Amidon indicator: Se dizolvă 27 g NaCl în puţină apă şi se încălzeşte la fierbere. Se adaugă 1 g amidon amestecat cu 5 ml apă distilată rece. Se continuă fierberea până la clarificare. Se răceşte, se filtrează şi se completează cu apă distilată la 100 ml

Modul de lucru

Intr-un flacon de titrare cu dop rodat (flacon iodometric) se pipetează 10 ml bicromat de potasiu (n_1), se adaugă 10 ml H_2SO_4 25 %, apă distilată fiartă şi răcită 50 ml şi 10 ml iodură de potasiu. Se lasă la întuneric 10 minute pentru eliberarea iodului.

Soluţia colorată în brun datorită iodului pus în libertate se titrează cu tiosulfat până la coloraţia galben pai, se adaugă 1 ml amidon, se titrează cu tiosulfat în continuare până la dispariţia culorii albastre.

Se notează numărul de ml de tiosulfat de sodiu consumaţi în total cu (n_2).

$$T_{Na_2S_2O_3} = \frac{n_1}{n_2} \cdot \frac{248,19 \cdot 0,1}{1000}$$

PREPARAREA SI TITRAREA SOLUTIEI DE IOD 0,1 N

Pentru prepararea unei soluţii de iod, se va utiliza iod pur, care se poate obţine prin sublimări. Deoarece iodul este greu solubil în apă, se va dizolva într-o soluţie de iodură de potasiu.

Pentru soluţia 0,1 N se cântăresc 12,7 g I_2 într-o fiolă de cântărire cu dop rodat. Această cantitate de iod se dizolvă într-o soluţie foarte concentrată de iodură de potasiu (30 g KI în puţină apă). După completa dizolvare a iodului în soluţia de iodură de potasiu, se completează la 1 litru cu apă distilată. Soluţia astfel preparată se păstrează în sticle brune.

Determinarea titrului soluţiei de iod, se poate face cu substanţe etalon ca: trioxid de arsen As_2O_3 sau cu o soluţie de tiosulfat de sodiu de titru cunescut.

Principiu

Titrarea se bazează pe reducerea I_2 la I^- cu tiosulfat de sodiu în prezenţa amidonului ca indicator, până la viraj incolor, conform reacţiei:

$$I_2 + 2\ Na_2S_2O_4 = 2\ NaI + Na_2S_4O_6$$

Reactivi:

1. Sol. tiosulfat de sodiu 0,1 N
2. Sol. iod 0,1 N
3. Sol. amidon, indicator.

Modul de lucru

Intr-un flacon de titrare se pipetează exact 10 ml soluţie de iod (n_1) şi se titrează cu tiosulfat de sodiu până la galben pal. Se adaugă 1 ml amidon, soluţia devine albastră, după care se continuă titrarea până la decolorarea soluţiei. Se notează cu n_2 numărul de ml de tiosulfat consumat cu factor stabilit anterior.

$$T_{I_2} = \frac{n_2 \cdot f}{n_1} \cdot \frac{126,92 \cdot 0,1}{1000}$$

ARGENTOMETRIA

Cuprinde metodele de dozare volumetrică a halogenurilor şi a unor combinaţii organice, cu ajutorul unei soluţii de azotat de argint cu titru şi factor cunoscut, precum şi metodele de dozare a ionului de argint, cu ajutorul unor soluţii titrate de halogenură alcalină sau sulfocianură alcalină sau de amoniu. Sunt folosite două metode:

- Metoda MOHR - directă
- Metoda VOLHARD - indirectă (sau metoda excesului).

Prepararea soluţiei de $AgNO_3$ 0,1 N

Intrucât în reacţiile de precipitare $AgNO_3$ schimbă o sarcină activă (Ag^+), Eg_{AgNO_3} = masa moleculară.

$$M_{AgNO_3} = 168,89 \text{ g}; \quad Eg = 168,89 \text{ g}$$

Pentru o soluţie 0,1 N se cântăresc 17 g $AgNO_3$ ce se aduc cu apă distilată la 1000 ml.

Stabilirea titrului soluţiei de $AgNO_3$ 0,1 N, folosind ca substanţă etalon NaCl

a) Metoda Mohr

1. Prepararea soluţiei etalon de NaCl

Se usucă NaCl la greutate constantă prin încălzirea acesteia într-un creuzet de porţelan la temperatura de 500-600°C. Se cântăreşte cantitatea de NaCl necesară unei soluţii 0,1 N.

Eg_{NaCl} = masa moleculară = 58,46 g

Pentru o soluţie 0,1 N se cântăresc 5,846 g NaCl care se aduce cu apă distilată la 1000 ml.

2. Indicator

Soluţie apoasă de K_2CrO_4 5 g %

Principiul metodei: se precipită Cl^- în prezenţa cromatului ca indicator cu ionul Ag^+. Sfârşitul reacţiei este pus în evidenţă prin apariţia unui precipitat roşu cărămiziu de Ag_2CrO_4:

$Cl^- + Ag^+ = AgCl$ (reacţie de titrare)

La echivalenţă:

$$2\,Ag^+ + CrO_4^{2-} \longrightarrow Ag_2CrO_4$$

Modul de lucru

Din soluţia de NaCl 0,1 N se pipetează un volum de 10 ml,

se adaugă câteva picături de cromat de potasiu 5 % şi se titrează cu soluţia de $AgNO_3$ picătură cu picătură sub agitare continuă. In momentul când toţi ionii de clor au fost precipitaţi sub formă de AgCl, prima picătură de $AgNO_3$ adăugată în exces, va forma cu indicatorul un precipitat roşu cărămiziu de Ag_2CrO_4 indicând sfârşitul reacţiei. Cât timp în soluţie există Cl^- nu se formează Ag_2CrO_4 deoarece este mai solubil decât AgCl.

Calcul

n = ml NaCl 0,1 N; n_1 = ml $AgNO_3$ 0,1 N

$$Tx = \frac{n_1}{n_2} \cdot \frac{Eg_{AgNO_3} \cdot 0,1}{1000}$$

Stabilirea titrului $AgNO_3$ prin metoda excesului de $AgNO_3$ folosind ca etalon NaCl (Volhard)

Principiul metodei

Peste o cantitate cunoscută de NaCl se adaugă un exces de $AgNO_3$ când se va forma AgCl, rămânând neconsumat o parte din $AgNO_3$ introdus. Cantitatea de $AgNO_3$ rămasă neconsumată se va titra cu tiocianat de amoniu în prezenţa alaunului feriamoniacal - $FeNH_4(SO_4)_2$ în mediu de acid azotic până la viraj roz:

$$(Na^+ + Cl^-) + (Ag^+ + NO_3^-) \longrightarrow \underset{\text{pp.alb}}{AgCl} + (Na^+ + NO_3^-)$$

$$(Ag^+ + NO_3^-) + (NH_4^+ + SCN^-) \longrightarrow \underset{\text{pp.alb}}{AgSCN} + (NH_4^+ + NO_3^-)$$

$$Fe^{3+} + 3\,SCN^- \rightleftharpoons (Fe^{3+} + 3\,SCN^-)$$

sulfocianură ferică
coloraţie roşu intens

Pentru a putea calcula titrul $AgNO_3$ în urma acestei titrări trebuie să se cunoască raportul volumetric dintre aceste soluţii. Pentru cunoaşterea raportului între volumele celor două soluţii se titrează soluţia de $AgNO_3$ cu soluţia de tiocianat de amoniu (sulfocianură de amoniu); titrarea se execută în condiţiile amintite mai sus.

Reactivi

1. Sol. etalon de NaCl 0,1 N (vezi metoda Mohr)
2. Sol. tiocianat de amoniu 0,1 N (M=76,12):
   (8 g tiocianat de amoniu se dizolvă în apă şi se completează la 1000 ml)
3. Sol. alaun feriamoniacal 5 % (indicator)
4. Acid azotic concentrat.

Modul de lucru

a) Stabilirea raportului de volume între NH_4SCN şi $AgNO_3$. Se iau într-un flacon de titrare un număr de ml de $AgNO_3$ aproximativ 0,1 N (10 - 20 ml), notaţi cu n_1. Se adaugă 1 ml alaun feriamoniacal soluţie saturată (5 %), 2 ml HNO_3 pur conc. pentru decolorarea soluţiei de alaun. Se titrează cu NH_4SCN dintr-o biuretă până la viraj slab roz. Se notează numărul de ml de NH_4SCN consumaţi cu n_2. Din această titrare se stabileşte că n_1 ml $AgNO_3$ s-au titrat cu n_2 ml NH_4SCN.

b) Titrarea $AgNO_3$: pe o altă probă se iau n_3 ml NaCl 0,1 N (soluţie etalon), se adaugă un exces din soluţia de $AgNO_3$ (n_4), 1 ml alaun feriamoniacal şi 2 ml HNO_3 conc. Se titrează excesul de $AgNO_3$ până la viraj roz care nu dispare la agitare. Se notează numărul de ml de NH_4SCN consumaţi (n_5).

Calcul: se calculează mai întâi raportul de volume între $AgNO_3$ şi NH_4SCN.

Dacă n_1 ml $AgNO_3$ titrează . . . . . n_2 ml NH_4SCN

x . . . . . n_5 ml NH_4SCN

$$x = \frac{n_1 \cdot n_5}{n_2} = n_6 \text{ ml } AgNO_3$$ (excesul de soluţie de $AgNO_3$ rămas neconsumat).

Se calculează apoi volumul de $AgNO_3$ consumat de NaCl etalon- n_3.

n_4 ml $AgNO_3$ adăugat - n_6 ml $AgNO_3$ neconsumat = n_7 ml $AgNO_3$ consumaţi de NaCl luat în lucru.

$$F = \frac{n_3}{n_7}$$

$$T_{real\,AgNO_3} = \frac{n_3}{n_7} \cdot \frac{Eg_{AgNO_3} \cdot 0,1}{1000}$$

COMPLEXOMETRIE

Complexometria constă în metode de determinare cantitativă, volumetrice la baza cărora stau reacţiile cu formare de complecşi interni între anumite substanţe organice numite complexoni şi o serie de cationi.

Complexonii sunt acizi poliaminocarboxilici, dintre care mai des folosit este acidul etilendiamino-tetraacetic, sare de sodiu, numit complexon III sau EDTA, notat H_2Y^{2-}:

$$\begin{matrix} {}^{-}OOC - CH_2 \\ HOOC - CH_2 \end{matrix} \quad N - CH_2 - CH_2 - N \quad \begin{matrix} CH_2 - COO^{-} \\ CH_2 - COOH \end{matrix}$$

Titrările se bazează pe următorul mecanism: cationul de dozat împreună cu unul din complexoni (Z) formează chelatul respectiv conform reacţiei:

$$Me + Z \rightleftharpoons MeZ$$

Considerând complexonul III Na_2H_2Y, au loc reacţiile:

$$Me^{2+} + H_2Y^{2-} \rightleftharpoons MeY^{2-} + 2\,H^{+}$$
$$Me^{3+} + H_2Y^{2-} \rightleftharpoons MeY^{-} + 2\,H^{+}$$
$$Me^{4+} + H_2Y^{2-} \rightleftharpoons Me\,Y + 2\,H^{+}$$

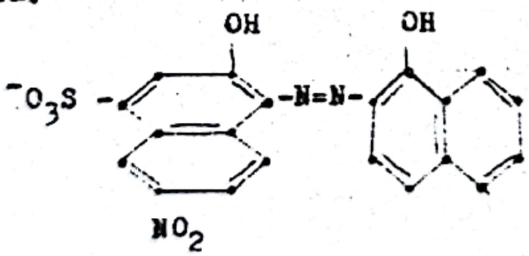
Intrucât din reacţie rezultă ioni H^{+}, titrările se vor efectua în prezenţă de soluţie tampon de un anumit pH, care asigură stabilitatea complexonatului format.

Punctul de echivalenţă în titrarea cu complexon III se determină cu ajutorul indicatorilor complexometrici care formează cu cationul tot un complex intern numit chelat. Complexul cationului cu indicatorul trebuie să fie mai puţin stabil decât cel al complexonului cu acesta.

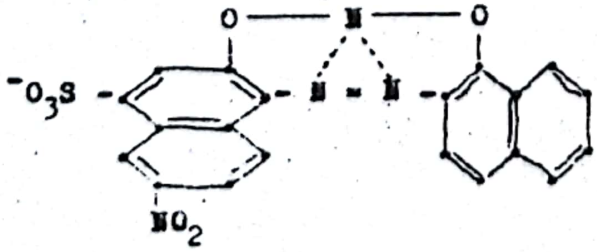
Indicatorii din complexometrie sunt coloranţi organici, iar unii dintre ei sunt indicatori de pH.

Indicatorii mai curent utilizaţi sunt: negru eriocrom T şi Murexidul.

Negru eriocrom T (erio T şi notat H_2I^{-}) are următoarea structură:

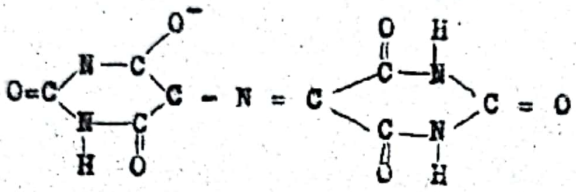


Cationii metalici bivalenţi (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Co^{2+}) formează cu indicatorul complecşi în raportul 1:1.



Negru eriocrom T este un colorant albastru la pH=7 - 11, iar la pH acid, ca şi complecşi (MeI) cu cationii Mg^{2+}, Ca^{2+}, Co^{2+}, şi chiar cu metalele trivalente, au coloraţia roşie.

Murexidul (notat H_4I^-) este sarea de amoniu a acidului purpuric şi are următoarea structură:



Cu cationii bivalenţi dă complecşi în raportul 1:1 de diferite culori: galben cu Ni^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, portocaliu cu Cu^{2+}, roşu cu Ca^{2+}. Murexidul la un pH=9 dă o coloraţie roşie. In soluţie apoasă este mult mai instabil decât negru eriocrom T şi de aceea se va lucra numai cu amestec de o picătură indicator la 100 picături NaCl, din care se utilizează pentru o titrare aproximativ 0,1 g corespunzător la 1 mg indicator.

Se întâlnesc următoarele tipuri de dozări:

1. Dozări directe a cationilor cu soluţia de complexon
2. Dozări prin metoda excesului de complexon
3. Dozări ale ionilor care nu reacţionează direct cu complexonii.

RECOLTAREA SI PRELUCRAREA METERIALULUI BIOLOGIC

RECOLTAREA SI PRELUCRAREA LA RECE

Pentru determinarea activităţii enzimatice se utilizează următoarele materiale biologice:

- omogenate tisulare
- hemolizate de sânge
- serul sanguin

Omogenate tisulare

In prepararea omogenatelor tisulare se disting două etape de lucru:

a) Obţinerea omogenatului prin distrugerea structurii tisulare şi ruperea membranei celulare.

b) Fracţionarea subcelulară şi separarea particulelor.

Această distrugere a structurii ţesuturilor şi celulelor se face în aşa fel încât să se poată asigura condiţiile:

- păstrarea structurii chimice a metaboliţilor
- păstrarea localizării particulelor subcelulare în celulă.

Pentru determinarea activităţii enzimatice importanţă deosebită are viteza şi temperatura la care se lucrează, mediul de extragere şi pH-ul acestuia.

a) Obţinerea materialului biologic

Izolarea organului propus ca material biologic se face repede, la temperatură joasă, menţinându-se în timpul manoperelor pe gheaţă.

Ruperea membranei celulare se efectuiază ţinând seama de proveniența celulelor. Pentru celulele animale se folosesc metode de dezintegrare celulară mai puţin violente decât cele utilizate pentru celulele vegetale sau cele microbiene care au membrana foarte rezistentă.

Metodele de dezintegrare celulară se pot grupa în:

1. Dezintegrarea termică (îngheţ-dezgheţ, amestec acetonă - CO_2, alcool - CO_2, azot lichid). Mai întâi celulele sunt congelate, după aceea se dezgheaţă treptat la temperatura camerei. Se repetă această operaţie de câteva ori. Prin îngheţare se formează cristale de gheaţă intracelulare. La încălzirea celulelor se rup membranele prin şoc osmotic.

2. Omogenizarea mecanică este cel mai utilizat procedeu.

- mojararea cu substanţe abrazive (nisip, praf de sticlă, alumină) este aplicată în general pentru dezintegrarea bacteriilor;

- omogenizare prin zdrobire cu ajutorul omogenizatoarelor coaxiale - omogenizatoare cu piston.

Timpul de omogenare variază în funcţie de ţesut, de la 30 secunde la 5 minute. Această metodă se utilizează numai pentru organe moi, cu puţin ţesut conjunctiv care ar împiedica rotirea pistonului.

3. Ultrasunetele. Se utilizează pentru liza eritrocitelor, pentru obţinerea enzimelor celulare, solubile şi ruperea membranelor nucleilor.

Mediile în care se face separarea au o anumită compoziţie în funcţie de tipul de ţesut sau de particula subcelulară izolată. Rolul mediului de separare este: să favorizeze dezistegrarea celulară, să conserve structura morfologică şi chimică a celulei şi componentele intracelulare.

Aceste medii au în compoziţia lor zaharoză, a cărei concentraţie variază între 0,1 şi 2,2 M. Izolările în soluţie de zaharoză se realizează la un pH între 7 - 7,4.

EDTA - ul în aceste medii este folosit pentru stabilizarea sistemului oxidant al acidului - cetoglutaric.

b) Fracţionarea particulelor subcelulare

Componentele subcelulare se separă din omogenatele tisulare pe baza deosebirii lor în mărime şi densitate. Fracţionarea se realizează prin centrifugare diferenţială, la temperatură scăzută de 0° la + $4^{\circ}C$. Sedimentarea particulelor este direct proporţională cu forţa centrifugă (F) a cărei valoare este determinată la rândul ei de numărul de rotaţii pe minut (n) şi de raza rotorului (R) în cm, conform ecuaţiei:

$$F = \frac{4^2 \cdot n^2 \cdot R}{3600}$$

Este mai comod ca forţa centrifugă să se exprime ca un multiplu al forţei gravitaţionale terestre, care acţionează asupra particulelor. Această forţă centrifugală se notează obişnuit cu "g" fiind obţinută din relaţia:

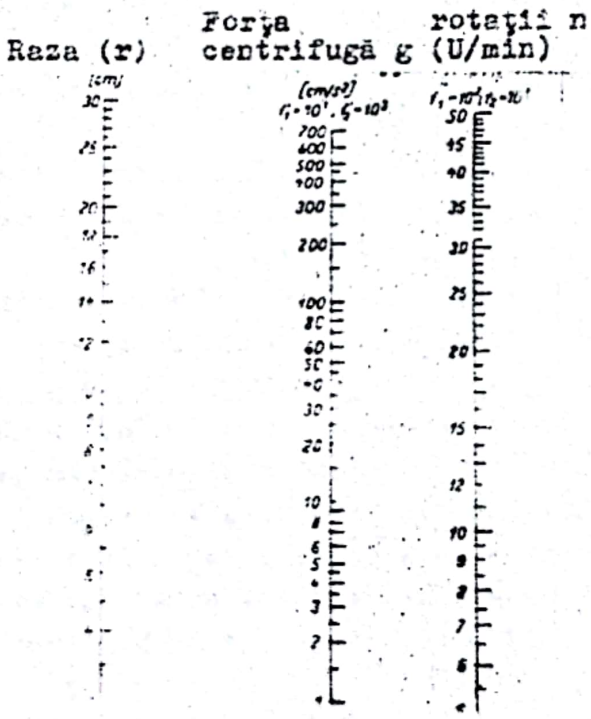
$$g = \frac{4^2 \cdot n^2 \cdot R}{3600 \cdot 981} = 1,11 \cdot 10^{-5} \cdot n^2 \cdot R$$

Calcularea forţei centrifugale relative (g) se face cunoscând raza (r) şi numărul de rotaţii pe minut (n).

Pentru uşurinţă s-a elaborat nomograma după care, funcţie de rază şi de numărul de rotaţii se determină numărul de "g".

Mărimea razei este dată de distanţa de la axa de rotaţie a centrifugii până la fundul cupei de centrifugă (pentru centrifugile orizontale) şi de distanţa de la axa de rotaţie până la extremitatea cea mai îndepărtată a cupei (pentru cele unghiulare).

Sedimentarea materialului care trebuie îndepărtat sau izolat depinde şi de timpul cât durează centrifugarea. Timpul necesar pentru sedimentarea particulelor subcelulare este invers proporţional cu pătratul vitezei de rotaţie şi cu pătratul razei particulei respective.



Nomograma pentru determinarea "g"

Scanned with OKEN Scanner

Exemplu: se dă r = 6 cm, U/min = 20 . 10^3.

Se unesc punctele căutate pe rază şi numărul de rotaţii cu ajutorul unei linii. Punctul de intersecţie pe scala din mijloc (numărul G) dă 27,5.

Numărul de turaţii se multiplică cu $f_2^1 = 10^3$ deoarece se foloseşte scala mijlocie $f_2^1 = 10^3$, obţinand astfel acceleraţia centrifugală 27,5 . 10^3 deci 27.500 g.

Viteza de sedimentare a particulelor este determinată nu numai de forţa centrifugală aplicata ci şi de alţi factori: densitatea particulei, densitatea şi vâscozitatea mediului.

Aceasta dependenţă este exprimată astfel:

- particulele se depun proporţional cu pătratul razei lor;
- viteza de sedimentare este direct proporţională cu diferenţa de densitate dintre particule şi mediu;
- cu cât este mai mare vâscozitatea mediului cu atat este mai înceată sedimentarea.

PREPARAREA OMOGENATELOR

Se pot face recoltări din diferite organe ca: ficat, creier, inimă, rinichi, muşchi.

Mediile în care se face omogenizarea şi sticlăria pentru lucru se păstrează la rece.

Reactivi şi aparatură

1. Sol. NaCl 9 g ‰
2. Sol. zaharoză 0,25 M
3. Omogenizator coaxial (Potter)
4. Centrifugă cu răcire.

Modul de lucru

Organul prelevat căruia i se îndepărtează ţesutul conjunctiv şi grăsimea se presează uşor cu hârtie de filtru după o spălare de câteva ori în ser fiziologic rece. Se fragmentează apoi mărunt cu un foarfece şi se transvazează în eprubeta omogenizatorului.

Pentru omogenizare se adaugă la 1 g ţesut proaspăt 10 ml soluţie ser fiziologic rece sau soluţie de zaharoză 0,25 M, se omogenizează timp de 2 minute în omogenizator coaxial (Potter) cu viteză de 1500 t/min.

Scanned with OKEN Scanner

Omogenatul astfel obţinut se centrifughează la 700 g timp de 5-10 minute. Se sedimentează nucleii, celulele întregi, debriurile celulare. Supernatantul se decantează şi se păstrează la rece pentru determinările enzimatice.

Standardizarea omogenatelor

Pentru a putea compara şi interpreta rezultatele determinărilor biochimice pe omogenat, materialul se standardizează fie prin raportarea la greutatea produsului de plecare (standard de preparare), fie prin raportarea la conţinutul proteic al omogenatului.

Standardul de preparare

Iniţial organul se cântăreşte. Funcţie de greutatea acestuia se realizează omogenate de 10 sau 20 % în diverse soluţii de omogenizare. Standardizarea se obţine preparând totdeauna omogenate de aceeaşi concentraţie.

Raportarea la conţinutul de proteine este cea mai utilizată metodă.

Pentru determinarea proteinelor celulare se folosesc diverse metode:

- Biuretul, care are o sensibilitate de 0,25 - 10 mg proteină/ml omogenat.
- Lowry, este cea mai sensibilă, 10 - 20 ug proteină/ml omogenat.
- Metoda raportului Abs.280/Abs.260 cu sensibilitatea de 0,05 - 2 mg proteină/ml omogenat.

Recoltarea sângelui

Pentru efectuarea determinărilor biochimice sângele se recoltează de regulă dimineaţa pe nemâncate prin puncţie venoasă.

In cazul determinărilor ultramicro, sau la determinarea hematocritului se poate utiliza sânge capilar recoltat din pulpa degetului, din călcâi (la nou-născuţi) sau din lobul urechii (la pacienţii în stare de şoc).

Recoltarea sângelui venos se efectuiază din venele plicii cotului (la adulţi şi copii mari) din fontanelă şi venele jugulare (la sugari şi copii mici).

Recoltarea din venele plicii cotului se face după următoarea tehnică:

- se fixează garoul deasupra cotului, se dezinfectează

tegumentul în locul puncţionării cu alcool 70 %;

- se puncţionează vena şi se recoltează sângele prin ac fie direct în eprubetă prin scurgere liberă, fie prin aspirare în seringă.

După recoltare se îndepărtează garoul şi se tamponează locul puncţionat cu un tampon de vată îmbibat în alcool.

Acul de recoltare şi seringa trebuie în prealabil sterilizate, iar vasele în care se recoltează trebuie să fie în perfectă stare de curăţenie şi uscare deoarece urmele de alcool, apă, pot produce hemoliza sângelui, iar diferitele impurităţi pot falsifica rezultatele dozărilor.

Poziţia corpului şi staza venoasă influenţează rezultatele obţinute în cazul determinărilor substanţelor microscopice (eritrocite) şi a celor cu greutate moleculară mare (proteine totale, fracţiuni proteice individuale, colesterol etc.).

In cazul determinării substanţelor cu greutate moleculară mică, poziţia corpului şi staza venoasă nu afectează valoarea rezultatelor, făcând excepţie lactatul, piruvatul şi amoniacul.

Analizele biochimice se pot efectua pe sânge total, plasmă sau ser.

Utilizarea sângelui total în cadrul diferitelor investigaţii este posibilă utilizând substanţe anticoagulante.

Anticoagulanţii sunt substanţe care împiedică procesul de coagulare a sângelui. Cei mai folosiţi anticoagulanţi sunt: oxalatul, citratul, fluorura, EDTA, soluţie de acid citric-dextroză, heparina.

Oxalatul de sodiu, potasiu, litiu împiedică procesul de coagulare prin legarea calciului. Se utilizează 0,01 ml soluţie de oxalat 20 % pentru 1 ml sânge. Se introduce soluţia de oxalat necesară în eprubete, apoi apa se evaporă la etuvă la 80°C. Evaporarea apei la 100°C determină descompunerea oxalatului cu pierderea efectului anticoagulant.

Ca anticoagulant, oxalatul produce crenelarea eritrocitelor şi drept urmare diluarea plasmei cu apa din eritrocite; se produce astfel o eroare mai mare de 5 % la analiza componentelor plasmatice. Oxalatul este contraindicat în determinarea electroliţilor: sodiu, potasiu, calciu, în studii de echilibru acido-bazic, la determinarea

anumitor enzime etc. In concentraţii mai mari oxalatul produce hemoliză.

- Citratul de sodiu, potasiu se utilizează în concentraţii de 5 mg/ml sânge. Este folosit pentru determinarea fibrinogenului. In concentraţie de 3,8 % citratul se foloseşte pentru determinarea vitezei de sedimentare a hematiilor (se utilizează 1 parte soluţie citrat pentru patru părţi sânge). Utilizarea citratului ca anticoagulant are aceleaşi dezavantaje ca şi oxalatul.

- Fluorura de sodiu, potasiu inhibă procesul de coagulare a sângelui prin legarea calciului şi parţial glicoliza eritrocitară.

Se utilizează în concentraţie de 10 mg fluorură de sodiu/ml sânge. Inhibă acţiunea ureazei asupra ureei. Nu poate fi folosită în analiza unor electroliţi.

Determină eliberarea anumitor componente intracelulare din eritrocite.

- EDTA (sare de sodiu) inhibă procesul de coagulare prin complexarea calciului. Se utilizează 1 mg sare de sodiu dihidrat/ml sânge. EDTA-ul nu afectează volumul eritrocitelor. Este impropriu pentru determinarea calciului, electroliţilor şi azotului rezidual. Inhibă ceruloplasmina şi fosfataza alcalină şi activează fosfataza acidă.

Se foloseşte în determinarea fibrinogenului şi a unor metaboliţi.

Soluţia ACD conţine:

- acid citric 4,7 g
- citrat trisodic 16,0 g
- glucoză 25,0 g
- apă demineralisată 100 ml

Se utilizează o parte soluţie şi patru părţi sânge.

Se foloseşte la conservarea sângelui de la donatori şi numai în condiţii sterile.

Heparina este anticoagulant fiziologic ideal, deoarece nu modifică starea fizico-chimică a sângelui. Se foloseşte ca heparinat de sodiu, potasiu, litiu sau amoniu. Se utilizează 75 unităţi/ml sânge (1 mg heparinat corespunde la 100 unităţi). Prin dizolvarea a 300 mg heparinat de amoniu în 200 ml apă demineralizată se obţine o soluţie care conţine 75 unităţi în 0,05 ml. Se recomandă introducerea soluţiei în eprubete şi apoi evaporarea apei la 90-100°

stare în care poate fi păstrată timp nelimitat. Cu heparinatul de amoniu se pot determina, cu excepţia amoniacului sanguin şi a fosfatazei acide, toţi metaboliţii, electroliţii şi enzimele.

Hemolizatele de sânge

Sângele se recoltează pe heparină sau perle de sticlă. Se centrifughează la rece la 4000 t/min, timp de 10 minute pentru îndepărtarea plasmei. Se spală apoi de 3 ori cu ser fiziologic, tot prin centrifugare, în proporţie de 1:3.

Se face hemoliza în apă distilată rece în proporţie 1 volum celule + 4 volume apă. Se centrifughează 5 minute la 2000 t/min. pentru îndepărtarea stromei.

Supernatantul este utilizat pentru determinarea activităţii enzimatice din eritrocite.

Dializa

Unele metode de laborator, necesită dializa hemolizatului sau a omogenatului în scopul îndepărtării unor ioni metalici. Produsul biologic este introdus într-un sac de colodiu sau de celofan de la rinichiul artificial, dializa efectuându-se faţă de apă distilată cu EDTA 300 mg %o, timp de 2 ore până la 24 ore, după indicaţiile metodei.

Volumul produsului biologic trebuie măsurat înainte şi după dializă.

RECOLTAREA SI CONSERVAREA URINII

Recoltarea urinii se efectuează imediat după emisie, în vase de sticlă acoperite, spălate cu soluţie de carbonat de sodiu şi apoi clătite bine cu apă distilată.

Pentru examenul sumar al urinii se foloseşte urina de dimineaţă, urină care prezintă concentraţie maximă.

Pentru examenul complet al urinii se foloseşte urina din 24 ore. Colectarea ei se face pornind de la o oră fixă de dimineaţă (ora 8 de exemplu). Cantitatea de urină emisă la această oră se aruncă şi apoi se adună toate emisiile de urină din următoarele 24 ore într-un vas cu conservanţi, în aşa fel încât, ultima urină de dimineaţă (ora 8,de exemplu) să se adune într-un vas separat.

Pentru determinările cantitative se recoltează o probă de urină din emisiunile reunite.

Este de recomandat ca urina să fie examinată imediat după emisie sau cel mult în 2-3 ore de la recoltare. In caz contrar se impune conservarea urinii fie prin congelare imediată (sub -20°C), fie prin adăugarea unor substanţe conservante care să nu modifice compoziţia chimică a urinii:

- timol 10 % în izopropanol (5 ml pentru urina colectată în 24 ore);
- acid clorhidric 10 N (50 ml pentru urina colectată în 24 ore).

Pentru identificarea glucidelor, urina trebuie să fie proaspătă şi recoltată la cel puţin 48 ore după ce subiectul în cauză nu a folosit nici un fel de medicament.

Pentru dozarea catecolaminelor şi substanţelor steroidice - se adaugă 50 ml HCl 10 N la urina din 24 ore (17 cetosteroizii nu pot fi determinaţi în urina conservată cu timol-izopropanol).

Pentru dozarea porfirinelor se recomandă recoltarea urinii în sticle brune şi determinarea imediat după recoltare (la urina din 24 ore se adaugă 5 g carbonat de sodiu).

Pentru determinarea electroliţilor (sodiu, potasiu, calciu etc.), precum şi a altor componente urinare (aminoacizi, proteine, creatinină etc.), se recomandă conservarea cu timol-izopropanol.

Pentru conservarea elementelor morfologice ale sedimentului urinar se recomandă adăugarea de formaldehidă 40 % (1 ml în 10 ml urină).

Pentru examenul bacteriologic al urinii nu se adaugă nici o substanţă chimică spre conservare, recoltarea făcându-se steril şi în vase sterile.

Scanned with OKEN Scanner

ENZIME

Principii de dozare a activităţii enzimatice

Enzimele sunt proteine catalitice care pot fi caracterizate prin următoarele proprietăţi:

- prezintă activitate catalitică mare în cantităţi mici;
- rămân neschimbate la sfârşitul reacţiei;
- nu modifică echilibrul reacţiilor reversibile, ele doar grăbesc instalarea acestui echilibru.

Deoarece enzimele se găsesc într-o concentraţie foarte mică în ser sau în extractele tisulare (100 mg/100 ml) dozarea lor cantitativă prin metodele utilizate în mod obişnuit pentru proteine nu este exactă.

Dozarea enzimelor se bazează pe determinarea activităţii lor, adică pe capacitatea lor de a cataliza o reacţie dată.

In condiţii optime (pH, temperatură, concentraţie ridicată de substrat, absenţa inhibitorilor), viteza de reacţie este proporţională cu cantitatea de enzimă din mediu.

Dozarea activităţii enzimatice se poate efectua în trei moduri:

1. Măsurarea scăderii concentraţiei substratului într-un interval de timp dat. Pentru aceasta, produsul biologic care conţine enzima este incubat cu o cantitate cunoscută de substrat. După un interval de timp se dozează cantitatea de substrat netransformat. Diferenţa dintre cantitatea de substrat introdusă şi cantitatea rămasă reprezintă cantitatea de substrat transformată în timpul incubării constituie o măsură a activităţii enzimatice. In acest mod se dozează activitatea catalazei, amilazei.

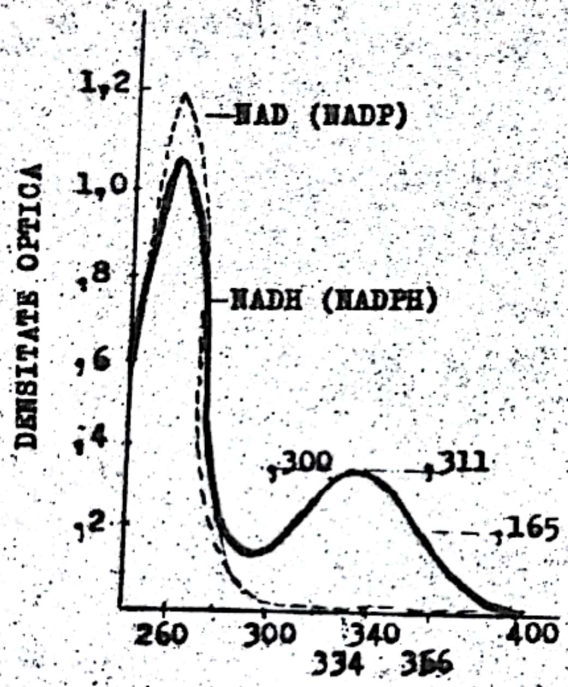
2. Măsurarea cantităţii de produs format într-o perioadă de timp dată (lipaza, tripsina, fosfataza, transaminaza, aldolaza).

3. Urmărirea dinamică (cinetică) din minut în minut a consumării substratului sau formării produsului de reacţie, atunci când substratul sau produsul sunt colorate sau absorb lumina în domeniul ultraviolet.

Măsurarea absorbţiei în ultraviolet se realizează cu un spectrofotometru iar metoda se numeşte test optic.

Testul optic a fost introdus de Otto Warburg în 1936 şi se

bazează pe faptul că NADH şi NADPH absorb lumina ultravioletă cu un maxim la 340 nm, în timp ce formele oxidate NAD^+ şi $NADP^+$ nu prezintă nici o absorbţie în domeniul 300 - 400 nm. Din acest motiv cu testul optic se poate măsura activitatea oricărei dehidrogenaze care necesită pentru activitate una din aceste coenzime.



În figură sunt prezentate spectrele de absorbţie pentru NAD şi NADPH.

Concentraţia (c) acestor coenzime fiind $0,05.10^{-3}$ mol/l.

Pentru grosimea de strat d = 1 cm, absorbţia optică (A) are valorile:

la 334 nm A = 0,300
340 nm A = 0,311
366 nm A = 0,165

Coeficientul de extinctie molară (ε) pentru NADH se poate calcula din relaţia:

$$A = c.d \longrightarrow \varepsilon = \frac{A}{c.d}$$

In cazul în care d = 1 cm, $\varepsilon = \frac{A}{c}$. Pentru 340 nm

$$340 = \frac{0,311}{0,05.10^{-3}} = 6,30.10^3;$$

$$334 = \frac{0,300}{0,05.10^{-3}} = 6,18.10^3$$

$$366 = \frac{0,165}{0,05.10^{3}} = 3,4.10^3$$

Dacă se cunoaşte ε se poate calcula concentraţia $c = \frac{A}{\varepsilon}$ (când d = 1 cm). Testul optic se utilizează pentru măsurarea activităţii tuturor dehidrogenazelor dependente de NAD^+ şi $NADP^+$.

Activitatea lactat dehidrogenazei (LDH) care catalizează reacţia reversibilă:

$$\text{Piruvat} + \text{NADH} + H^+ \rightleftharpoons \text{Lactat} + NAD^+$$

se poate măsura fie incubând soluţia care conţine enzima cu piruvat şi NADH la pH = 7,5, fie incubând enzima cu lactat şi NAD la pH = 8,9. In primul caz, extincţia va scădea pe măsură ce consumă NADH, iar în al doilea caz, extincţia va creşte pe măsura formări NADH din NAD.

Această metodă este comodă şi pentru măsurarea activităţii acelor enzime a căror activitate nu depinde de coenzimele piridinice. In acest caz, măsurarea se face prin cuplarea reacţiilor respective cu o reacţie de dehidrogenare. Exemplu: dozarea activităţii GOT care catalizează reacţia reversibilă:

$$\text{Acid aspartic} + \text{Acid } \alpha\text{-cetoglutaric} \overset{\text{GOT}}{\rightleftharpoons} \text{Acid glutamic} + \text{Acid oxalacetic}$$

Dacă în test se adaugă NADH şi exces de malat dehidrogenază (MDH), se poate determina activitatea GOT deoarece acidul oxalacetic format în prima reacţie este redus în reacţia catalizată de MDH:

$$\text{Acid oxalacetic} + \text{NADH} + H^+ \overset{\text{MDH}}{\rightleftharpoons} \text{Acid malic} + NAD^+$$

Pentru fiecare mol de acid aspartic convertit la acid oxalacetic se formează un mol de NAD şi extincţia va scădea proporţional cu activitatea GOT.

Reacţia catalizată de MDH serveşte drept reacţie indicator.

Un alt exemplu, este dozarea activităţii CPK (creatin-fosfokinazei) care catalizează reacţia de transfer a unui grup fosfat de pe creatin-fosfat (CrP) pe ADP, conform reacţiei:

$$Cr\text{-}P + ADP \xrightleftharpoons{CPK} Creatină + ATP$$

ATP generat în această reacţie serveşte în reacţia hexokinazei (HK) pentru formarea G_6P din glucoză:

$$ATP + glucoză \xrightarrow{HK} ADP + G_6P$$

G_6P participă în reacţia G_6PHD care necesită $NADP^+$ (reacţia indicator):

$$G_6P + NADP^+ \xrightleftharpoons{G_6PDH} 6\text{-}P\text{-}gluconat + NADPH + H^+$$

Pentru fiecare mol de fosfat transferat de ADP de către CPK, se generează o moleculă de NADPH prin intermediul HK(enzimă auxiliară) şi G_6PDH (enzimă indicator):

Atât enzima auxiliară cât şi enzima indicator vor fi adăugate în exces pentru ca reacţia să nu fie frânată datorită concentraţiei lor scăzute.

Activitatea enzimatică se exprimă în unităţi internaţionale (U). Unitatea internaţională este definită drept cantitatea de enzimă care catalizează transformarea unui micromol (µmol) de substrat pe minut în condiţii definite.

Prin condiţii definite se înţelege: temperatură (25°C), pH, sistemul tampon, concentraţia substratului şi a coenzimei.

In clinică se obişnuieşte să se raporteze activitatea enzimatică la 1 ml ser sau plasmă. Pentru a îndepărta inconvenientul de a utiliza valorile numerice mici, se utilizează exprimarea activităţii enzimatice în mU/ml:

mU = mµmol substrat/minut

Numeric mU/ml = U/l

Dozarea activităţii lactat dehidrogenazei (LDH) în ser.

Principiu

Lactat: NAD-oxidoreducaza sau lactat dehidrogenaza (E.C.1.1.1.27) catalizează reacţia reversibilă:

$$Piruvat + NADH + H^+ \rightleftharpoons lactat + NAD^+$$

Scăderea absorbţiei optice la 340 nm este proporţională cu activitatea enzimei.

Reactivi:

1. Sol.tampon tris-maleat 0,2 M; pH-7,4 sau tampon

fosfat M/15; pH = 7,4.

2. Sol. piruvat de sodiu 8 mg/ml (sol. tamponată la pH=7,4).

3. Sol. NADH 7 mg/ml în $NaHCO_3$ 1 %.

Modul de lucru:

In cuva de quarţ cu diametrul de 0,5 cm a spectrofotometrului se introduc:

- tampon Tris-maleat pH=7,4	1,78 ml
- NADH	0,02 ml
- ser	0,1 ml

Se agită şi se citeşte extincţia (E_o) la 340 nm. Se adaugă apoi 0,1 ml piruvat şi se porneşte cronometrul, se agită şi se citeşte din minut în minut, timp de 5 minute E_1 . . . . E_5.

Dacă extincţia pe minut scade mai mult de 0,020, se diluiază serul cu o soluţie tampon până se obţin scăderi ale extincţiei cuprinse între 0,020 - 0,010.

Calcul:

Se notează:

ΔE = variaţia extincţiei/min. (media a trei citiri consecutive);

V = volumul lichidului din cuvă;

6,30 = coeficient de extincţie molară a NADH la 340 n

Dacă un Umol NADH 6,30

x E/min.2.V

$$x = \frac{\Delta E/min.2.V}{6,3} = \mu mol$$ NADH corespunzător volumului de ser din cuvă.

Pentru a exprima activitatea pe ml ser, se multiplică cu 10. Obişnuit activitatea se exprimă în mU/ml.

Valori normale

Până la 195 mU/ml

Observaţii

- Activitatea LDH este egală în ser şi în plasmă.
- La temperatura camerei, în 24 ore se pierde aproximativ 25 % din activitatea enzimei.
- In soluţii diluate, enzima se inactivează rapid.
- Congelarea nu produce pierderi mari de activitate.
- Recoltarea sângelui se face pe heparină.
- In plasma citratată activitatea LDH este cu 40 % mai scăzută decât în ser.

- Oxalatul inhibă activitatea LDH.

Interpretare

Dozarea activităţii LDH este utilă în diagnosticul bolilor de sânge, infarct miocardic şi al bolilor de ficat.

Boli de sânge

Cea mai mare activitate serică LDH a fost observată în cazurile netratate de anemie pernicioasă (valori până la 7 000 mU/ml). Prin terapia cu vitamina B_{12} valorile revin la normal înainte de răspunsul reticulocitozei, ceea ce constituie cel mai sensibil indicator pentru eficacitatea terapiei. Valori mai mult sau mai puţin ridicate au fost observate în anemia hemolitică acută (valori până la 1000 mU/ml), dar în tipurile cronice de obicei nu are loc modificarea activităţii LDH.

Valori mari de activitate LDH serice au fost întâlnite în mononucleoza infecţioasă.

Infarct miocardic - activitatea LDH serică creşte, atingând un maxim după 3-5 zile (250-800 mU/ml), valori care revin la normal după 10-15 zile.

Activitatea LDH, spre deosebire de activitatea GOT, rămâne ridicată o perioadă de timp mai lungă, permiţând diagnosticarea şi în etapele târzii ale bolii.

In anghina pectorală nu are loc o creştere a activităţii LDH, ceea ce permite diferenţierea de I.M.

Boli de ficat

Creşterea activităţii LDH în hepatita acută (până la 500 mU/ml) este mai moderată în comparaţie cu creşterea activităţii GOT şi GPT.

Valori extrem de crescute au fost întâlnite în afecţiunile toxice acute ale ficatului (intoxicaţia cu ciuperci, cu tetraclorură de carbon şi alţi solvenţi).

In bolile cronice de ficat, modificări ale LDH sunt mici şi nu sunt utilizate în diagnostic.

Tumori

Creşteri foarte mari ale activităţii LDH sugerează prezenţa carcinomului în stare metastatică în special de ficat. Valorile normale ale LDH în ser, nu exclud existenţa tumorii.

Scanned with OKEN Scanner

IZOENZIMELE LACTATDEHIDROGENAZEI

Majoritatea enzimelor există în două forme multimoleculare multiple, denumite de Markert izoenzime care cataliseazâ aceeaşi reacţie dar se deosebesc prin proprietăţile fizico-chimice.

Izoenzimele LDH sunt cele mai studiate datorită aplicării lor în diagnostic.

LDH este constituită din două tipuri de subunităţi polipeptidice notate H (heart) şi M (muscle). Prin combinarea acestor unităţi în grupe de câte 4, se formează 5 izoenzime notate de la 1 - 5, repartizate prin migrare electroforetică de la anod la catod, cu următoarele structuri:

LDH 1 = H_4M_0

LDH 2 = H_3M_1

LDH 3 = H_2M_2

LDH 4 = H_1M_3

LDH 5 = H_0M_4

Repartiţia acestor izoenzime în ţesuturi este diferită. Astfel, LDH 5 care se găseşte în cantitate mare în ficat şi muşchiul scheletic este aproape absentă în inimă, iar LDH 1 prezentă în cantitate mare în muşchiul inimii, apare sub formă de urme în ţesutul hepatic.

Metodele de dozare a izoenzimelor LDH se bazează pe proprietăţile fizico-chimice diferite ale acestora: mobilitate electroforetică, stabilitate termică, adsorbţia selectivă pe DEAE-Celuloză sau DEAE-Sephadex, specificitatea de substrat, inhibiţia cu uree etc.

DOZAREA ACTIVITATII IZOENZIMEI LDH_1
(α-hidroxibutirat dehidrogenaza)

Principiu

LDH_1 cunoscută şi sub numele de α-hidroxibutirat dehidrogenaza, catalizează reacţia:

$$\text{2 - oxobutirat} + NADH + H^+ \xrightarrow{\alpha\text{-HBDH}} \alpha\text{-hidroxibutirat} + NAD^+$$

Oxidarea NADH în această reacţie este urmărită prin scăderea absorbţiei la 340 nm, scădere care este proporţională cu activitatea enzimei.

Reactivi:

1. Sol. tampon Tris-maleat 0,2 M, pH=7,4 (sau tampon fosfat M/15 pH=7,4).
2. Sol. NADH 7 mg/ml în $NaHCO_3$ 1 %
3. Sol. 2-oxobutirat 10 mg/ml.

Modul de lucru

Se procedează la fel ca la dozarea LDH cu piruvat.

Valori normale

Până la 140 mU/ml ser

Interpretare

In serul normal raportul α-HBDH/LDH = 0,62 - 0,82 (LDH/HBDH = 1,21 - 1,61.

Boli de inimă

In 90 % din cazurile de infarct cardiac, activitatea α-HBDH a fost crescută la 12 ore de la apariţia simptomelor clinice şi atinge valoarea maximă (de 2 - 10 ori valoarea normală) în 48-72 ore.

Revenirea activităţii α-HBDH are loc treptat, încât la 14 zile de la accident se poate detecta un infarct cardiac cu ajutorul raportului α-HBDH/LDH, care este crescut paralel cu o activitate totală LDH normală.

Revenirea raportului α- HBDH/LDH la valori normale şi chiar scăderea lui în timpul infarctului cardiac, indică o insuficienţă cardiacă dreaptă cu congestie acută a ficatului sau insuficienţă circulatorie.

Raportul α-HBDH/LDH permite diagnosticul diferenţial între infarctul miocardic şi angina pectorală, fără infarct sau embolie pulmonară, pancreatită sau ulcer perforat, în care valoarea este normală sau scăzută.

Boli de ficat

In afecţiunile acute celulare (hepatite acute, stress acut în cirozã, intoxicaţii, congestii acute hepatice) paralel cu activitatea totală LDH crescută, activitatea α-HBDH este crescută deşi raportul este scăzut la 0,3.

In bolile cronice de ficat, paralel cu valori ale LDH totale normale sau uşor crescute, raportul este normal sau uşor scăzut.

In metastazele hepatice, activitatea LDH totală şi α-HBDH este variabilă (uşor sau puternic crescute), dependentă de participarea parenchimului hepatic la modelul izoenzimatic al LDH din ser.

Bolile de sânge

Valori foarte ridicate, paralel cu creşterea raportului α-HBDH/LDH, sunt întâlnite în anemia pernicioasă netratată, anemie hemolitică, leucemia parablastică acută, mai rar în mieloza cronică.

O afecţiune hepatică secundară duce la normalizarea sau scăderea raportului α-HBDH/LDH.

Tumori

Procesele maligne avansate pot produce o creştere a activităţii α-HBDH în ser aproximativ paralel cu creşterea activităţii totale LDH.

α-HBDH/LDH este normal sau crescut în metastazele hepatice dar poate fi şi scăzut.

DOZAREA ACTIVITATII GLUCOZO-6-FOSFAT DEHIDROGENAZEI (G_6PDH) IN ERITROCITE

(Georg Wilelm Löhr şi Hans Dierek Waller)

Principiu

Glucoze-6-fosfatdehidrogenaza (E.C.1.1.1.49) catalizează reacţia următoare:

$$\text{Glucoz-6-fosfat} + \text{NADP} \rightleftharpoons \text{6-fosfogluconat} + \text{NADPH} + H^+$$

Se determină activitatea acestei enzime după cantitatea de NADPH format.

NADPH prezintă absorbţie la 340 nm şi se urmăreşte creşterea absorbţiei care va fi proporţională cu activitatea G_6PDH.

Reactivi

1. Sol. clorură de sodiu 9 g %o
2. Sol. tampon Tris 0,2 M; pH=7,4
3. Sol. glucoz-6-fosfat (sare de sodiu) $3,5.10^{-2}$ M (10 mg la 1 ml apă distilată)
4. Sol. NADP (sare de sodiu) 10^{-2} M (7 mg la 1 ml apă distilată).

Modul de lucru

In cuva de cuarţ a spectrofotometrului cu diametrul de 0,5 cm se introduc:

- tampon Tris-maleat pH=7,4	1,8 ml
- NADH	0,025 ml
- hemolizat	0,03 ml

Se citeşte E_0 (extincţia 0), se adaugă glucoz-6-fosfat 0,1 ml şi apoi se citeşte extincţia din minut în minut timp de 5 minute.

Se face media şi se află variaţia extincţiei pe minut.

Calcul

Se notează:

E = variaţia extincţiei/minut

V = volumul lichidului din cuvă

6,22 reprezintă coeficientul de extincţie la 340 nm.

Dacă 1 umol NADPH 6,22

X . . . . . E x 2 x V

$$x = \frac{E \times 2 \times V}{6,22}$$ umoli NADPH corespunzători cantităţii de soluţie de analizat din cuvă, adică 0,3 ml hemolizat. Pentru a exprima pe ml de hemolizat se înmulţeşte cu 33, iar pentrucă diluţia hemolizatului a fost de 1 la 5, pentru a exprima pe ml de celule se înmulţeşte cu 5:

µmoli/ml celule/minut = x . 33 . 5

Valori normale

1,27 - 1,78 unităţi/ml

Interpretare

Deficitul de G_6PDH este întâlnit la subiecţii de rasă neagră care prezintă o anemie hemolitică declangată de primachină. Ulterior s-au descris anemii hemolitice la subiecţii de rasă albă. Unele medicamente produc anemie prin deficit de G_6PDH (sulfamide, aspirine, cloramfenicol).

Deficitul în G_6PDH se întâlneşte şi în favism, icter hemolitic neonatal, anemie hemolitică cronică. Frecvenţa este foarte diferită.

DOZAREA ACTIVITATII GLUTAMAT DEHIDROGENAZEI (GLDH) IN PLASMA

Principiu

Glutamat dehidrogenaza (E.C.1.4.1.2.) cataliseaza reacţia:

$$\alpha\text{-cetoglutarat} + NH_4^+ + NAD(P)H + H^+ \rightleftharpoons L\text{-glutamat} + NAD(P) + H_2O$$

Echilibrul reacţiei este în favoarea formării de acid glutamic şi a oxidării NAD(P)H, determinat spectrofotometric la 340 nm Se urmăreşte scăderea densităţii optice ΔE/minut.

Reactivi

1.Sol.tampon fosfat M/15; pH=8

2. Sol. α-cetoglutarat (sare de sodiu) 0,4 M

3. Sol. acetat de amoniu 3 M

4. Sol. EDTA 0,26 M
5. Sol. cisteină 0,02 M
6. Sol. NADH 7 mg/ml în $NaHCO_3$ 1 %

Modul de lucru

Intr-o cuvă de cuarț cu grosimea de strat de 0,5 cm se pipetează:

- tampon fosfat pH=8,0	1,64 ml
- NADPH	0,03 ml
- EDTA	0,02 ml
- acetat de amoniu	0,07 ml
- hemolizat, plasmă sau omogenat	0,1 ml
- cisteină	0,1 ml

Se amestecă cu o baghetă de plastic și se citește E_o la 340 nm. Se adaugă apoi 0,04 ml sol. -cetoglutarat, se agită și se citește din minut în minut, timp de 5 minute (extincțiile E_1 . . . . E_5).

Se face media a trei citiri consecutive și se află variația extincției pe minut.

Calcul

Se notează:

ΔE = variația extincției/minut
V = volumul lichidului din cuvă
6,30 = coeficient de extincție NADH la 340 nm.
Dacă 1 umol NADH 6,22
x E.2.V

$$x = \frac{E.2.V}{6,30}$$ /umol NADH corespunzători cantității de soluție de analizat din cuvă, adică 0,1 ml. Pentru a avea la ml de plasmă se înmulțește cu 10.

/umoli/ml/minut = x.10

Valori normale

Până la 0,9 mU/ml plasmă

Interpretare

Determinarea activității GLDH în ser are valoare în diagnosticul bolilor de ficat pentru 2 motive. Pe de o parte conținutul în GLDH în ficat este mai mare decât în alte organe, astfel că GLDH poate fi considerată o enzimă specifică a ficatului; pe

de altă parte GLDH este prezentă exclusiv în mitocondriile celulelor ficatului.

Prin urmare, numai necroza celulelor hepatice cauzează o creştere a activităţii GLDH în ser. Din cauza aceasta, gradul creşterii activităţii GLDH în ser este relativ mic chiar în distrugeri severe a celulei hepatice (rar mai mult decât 50 mU/ml), în contrast cu glutamic piruvic transaminaza citoplasmatică şi cu glutamic oxalacetic transaminaza parţial mitocondrială. Astfel, deşi este specifică ficatului este nejudicios de a evalua numai activitatea GLDH.

Determinarea simultană a GLDH şi a ambelor transaminaze, totuşi, are valoare din două motive: pentru evaluarea vitezei necrozei şi pentru diagnosticul diferenţial al icterului.

In hepatita acută, activitatea GLDH este totdeauna crescută în timpul primelor săptămâni (10 - 20 mU/ml în medie, valori mai mari în formele necrozante).

Transaminazele, totuşi, cresc de 25 - 50 ori mai mult în bolile difuze ale ficatului, astfel că raportul $\frac{GOT + GPT}{GLDH}$ este mai mare de 50.

In cursul hepatitei, GLDH adesea revine la normal într-o săptămână, înaintea transaminazelor. Aceasta o face să nu fie corespunzătoare ca un criteriu pentru aprecierea cursului bolii.

Hepatita cronică şi ciroza

In inflamaţia cronică a ficatului, creşterea activităţii GLDH este frecvent găsită în ser, chiar numai cu o activitate moderat crescută a transaminazelor.

In timpul unei exacerbări acute, GLDH atinge valori ca şi în hepatita acută sau mai mari. Creşterea transaminazelor , totuşi este frecvent mai mică decât în hepatita acută, astfel că raportul $\frac{GOT + GPT}{GLDH}$ atinge valori între 30 - 40.

Aceasta poate diferenţia o hepatită acută de o exacerbare a hepatitei cronice sau o ciroză subclinică.

In timpul comei hepatice, o creştere a activităţii GLDH în ser cu simultana descreştere a transaminazelor este de un prognostic rău.

Icter obstructiv

In icterul obstructiv, activitatea GLDH este frecvent găsită a fi în acelaşi domeniu ca în hepatita acută.

Dar întrucât transaminazele sunt în mod obişnuit considerabil mai scăzute decât în hepatita acută, raportul $\frac{GOT + GPT}{GLDH}$ este mai mic de 15.

PUNEREA IN EVIDENTA A PEROXIDAZELOR

Peroxidaza (donor: H_2O_2 - oxidoreductaza) catalizează reacţia de descompunere a apei oxigenate, protejând astfel celula de acţiunea ei vătămătoare. Reacţia catalizată de peroxidază poate fi redată prin relaţia:

$$AH_2 + H_2O_2 \longrightarrow 2\,H_2O + A$$

H_2O_2 funcţionează ca acceptor de electroni, iar compusul AH_2 ca donor, spre deosebire de catalază unde AH_2 este tot H_2O_2.

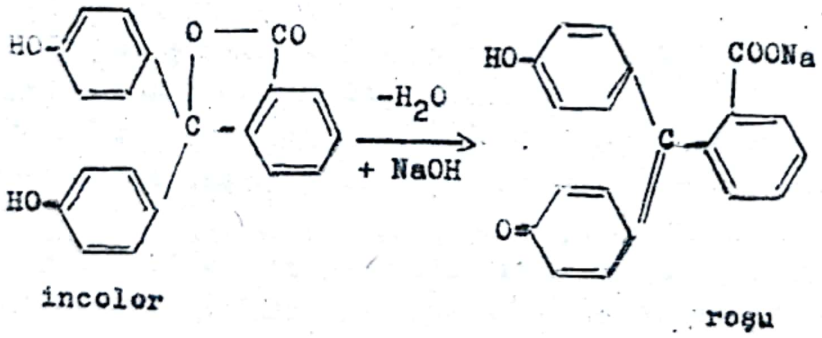
In cazul peroxidazei, compusul AH_2 poate fi un compus de tipul aminelor aromatice, fenolilor, aminoacizilor.

Peroxidaza prezentă în ţesuturile şi lichidele de origine animală a fost pusă în evidenţă în special în eritrocite, măduva osoasă, ficat.

1. Reacţia de identificare cu fenolftaleină.

Principiul metodei

Reactivul Kastle-Meyer (fenolftaleină redusă) datorită oxigenului activ ce se formează sub acţiunea peroxidazei, colorează mediul de reacţie la pH alcalin în roşu-violet.



incolor roşu

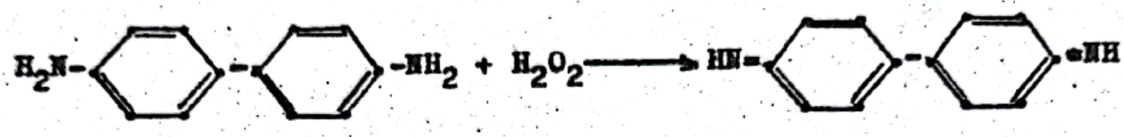
Modul de lucru

Intr-o eprubetă ce conţine 2 ml apă distilată se introduc 1 - 2 pic. de sânge, 2-3 picături de apă oxigenată şi 2-3 pic. reativ Kastle-Meyer. Prezenţa peroxidazei este indicată de apariţia culorii roşu violet.

2. Reacţia de identificare cu benzidină

Principiul metodei

Peroxidaza catalizează descompunerea apei oxigenate, care în mediu acid oxidează benzidina, moment în care conţinutul eprubetei capătă culoare albastră. Reacţia se utilizează pentru punerea în evidenţă a sângelui în lichidele biologice.



Reactivi

1. Benzidină
2. Acid acetic glacial
3. Apă oxigenată 3 %

Modul de lucru

Acid acetic, apă oxigenată amestec părţi egale (0,5 + 0,5) ml la care se adaugă câţiva cristali de benzidină. Se împarte soluţia în două eprubete, una martor, iar alta este proba în care se adaugă 1-2 picături din produsul de analizat. In proba pozitivă va apare o coloraţie verde-albastră datorită prezenţei urmelor de sânge (deci a peroxidazei).

Interpretare

In urină apare fie hemoglobina liberă (hemoglobinurie), fie hematii (hematurie).

Hematuria poate apare în boli ale căilor urinare sau în boli hemoragice. Dacă cantitatea de sânge este mică, urina este roşie clară, iar dacă este mare, culoarea este închisă, uneori, când hemoglobina este transformată în methemoglobina (hemiglobina), urina este brună.

Hemoglobinemia apare în cazul unor procese hemolitice masive, în care Hb nu poate fi transformată în pigmenţi biliari şi trece prin filtrul renal, fiind eliminată în urină. Distrugeri masive de hematii pot apare în infecţii grave, intoxicaţii, arsuri grave, crize de malarie, marşuri forţate, anemii hemolitice, diferite forme de sifilis, enzimopatii eritrocitare. Urina este în general roşie sau roşie închis şi conţine pe lângă Hb, proteine, oxalaţi de calciu şi adesea pigmenţi biliari.

Pentru decelarea sângelui sau hemoglobinei, urina trebuie să fie proaspătă. Pentru a nu obţine rezultate false, cel puţin

cel puţin 3-4 zile de recoltarea probelor, pacientul trebuie să nu consume carne, peşte, bulion de carne sau ori ce alt fel de extract de carne sau să nu i se administreze preparate de fier. Se va avea în atenţie, în cazurile cu constipaţie habituală sau accidentală.

DOZAREA ACTIVITATII CATALAZEI DIN SANGE
(Metoda Bach Zubcovu)

Principiu

Catalaza din sânge, descompune apa oxigenată cu eliberare de oxigen molecular.

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalaza}} 2\ H_2O_2 + O_2$$

Pentru dozarea activităţii catalazei, se determină cantitatea de apă oxigenată descompusă de catalaza din sânge în 30 minute la 17°C.

Reactivi

1. Sol. apă oxigenată 1 % (3,3 ml perhidrol la 100 ml apă distilată).
2. Sol. acid sulfuric 10 %
3. Sol. permanganat de potasiu N/10
4. Alcool amilic

Modul de lucru

Se recoltează din pulpa degetului, cu o micropipetă, 0,1 ml sânge şi se introduc într-un balon cotat de 100 ml, care conţine 10 ml apă distilată. Se amestecă pentru a se produce hemoliza. Se completează apoi cu apă distilată până la semn, obţinând astfel o diluţie a sângelui de 1/1000.

Se iau 4 baloane Erlenmeyer în care se introduc:

	Probă (ml)		Martor (ml)	
	1	2	3	4
Apă distilată	10	10	10	10
Sânge dil.1/1000	1	1	1	1

Se fierb baloanele 3 şi 4 pentru a distruge activitatea catalazei, după care se răcesc şi se adaugă:

Sol.apă oxigenată	2	2	2	2

Se agită şi se lasă în repaus timp de 30 minute la 17°C, după care se adaugă:

Acid sulfuric 1o %	5	5	5	5
Alcool amilic	2-3 pic		2-3 pic.	

Toate probele se titrează cu permanganat de potasiu N/10 până la culoare roz stabilă. Se noteaza numărul de ml de permanganat de potasiu N/10, folosiţi la fiecare balon în parte.

Calcul

Cifra catalazei = $(N - N').1,7$

N reprezintă media cantităţii, în ml de permanganat de potasiu utilizaţi la titrarea soluţiei de apă oxigenată din martorul 3 şi 4, iar N' reprezintă acelaşi lucru pentru proba 1 şi 2.

1,7 provine: echivalentul gram al apei oxigenate este 17 g. Un ml de permanganat de potasiu N/10 corespunde la 1,7 mg apă oxigenată.

$$\text{Indicele catalazei} = \frac{\text{cifra catalazei}}{\text{nr.milioane globule roşii}}$$

Valori normale

Cifra catalazei = 14 - 18

Indicele catalazei = 42 - 53

Observaţii

Determinarea acţiunii catalazei se face la temperatura de 17°C, deoarece la 37°C este activă proteaza, care distruge cataliza.

Numai indicele catalazei are valoare de diagnostic, deoarece aceşti indici pot fi comparaţi între ei.

Interpretare

In afecţiunile hepatice, indicele catalazei este scăzut în 80 % din cazuri. De asemenea, întâlnim scăderi în cancer, anemie, caşexie, etc.

DOZAREA ACTIVITATII TRANSAMINAZELOR

Principiu

Transaminazele catalizează reacţia de transfer a unei grupări amino de la un α-aminoacid la un α-cetoacid.

a) Glutamicoxalacetic-transaminaza (GOT) catalizează transferul grupării amino de la acidul l-aspartic la acidul α-cetoglutaric, rezultând acid L-glutamic şi acid oxalacetic.

b) Glutamicpiruvic-transaminaza (GPT) catalizează transferul grupării amino de la L-alanină la acidul α-cetoglutaric şi rezultă acid glutamic şi acid piruvic. Piruvatul şi oxalacetatul care trece spontan în piruvat) reacţionează cu 2,4-dinitrofenilhidrazina în mediul alcalin şi formează 2,4-dinitrofenilhidrazonă de culoare roşie, care se determină fotometric. Activitatea transami-

nazelor se calculează în funcţie de concentraţia piruvatului care se formează într-un minut.

Reactivi:

1. Tampon fosfat pH=7,4
   Sol.A: $Na_2HPO_4.2H_2O$ 11,866 g
   Apă distilată până la 1000 ml
   Sol.B: KH_2PO_4 9,073 g
   Apă distilată până la 1000 ml
   Se amestecă 81,8 ml sol.A cu 18,2 ml sol. B
2. Substrat GOT:
   - acid aspartic 100 mM 1,331 g
   - acid alfacetoglutaric 29 mg
   - soluţie tampon fosfat 50 ml
   Se aduce la pH=7,4 cu NaOH 2 N
   - se completează la 100 ml cu tampon fosfat
3. Substrat GPT:
   - L-alanină 200 mM (sau DL-alanină) 1,782 g
   - acid alfacetoglutaric 2 mM 29 mg
   - sol. tampon fosfat 50 ml
   Se aduce la pH=7,4 cu NaOH 2 N
   - Se completează cu tampon fosfat la 100 ml

Se adaugă câte 0,3 ml cloroform la ambele substraturi şi se agită. Se conservă la rece aproximativ 2 săptămâni.

4. Sol. 2,4-dinitrofenilhidrazină 1 mM
   - 2,4-dinitrofenilhidrazină 19,8 mg
   - acid clorhidric conc. (d=1,19) 10 ml
   - apă distilată, completare la 100 ml
5. Sol.hidroxid de sodiu 0,4 N
6. Sol. standard piruvat 2 mM:
   - piruvat de sodiu 22 mg
   - tampon fosfat pH=7,4 100 ml

Se adaugă 0,3 ml cloroform şi se agită. Se conservă la rece aproximativ 2 săptămâni.

Tehnica de lucru:

Se pipetează probele (P), standard (S), şi un blanc (B).

Enzimele	GOT			GPT		
	P	E	M	P	E	M
Substrat GOT, ml	0,5	0,5	0,5	-	-	-
Substrat GPT, ml	-	-	-	0,5	0,5	0,5
Se incubează 5 min.la 37°C						
Ser, ml	0,1	-	-	0,1	-	-
Sol.standard piruvat	-	0,1	-	-	0,1	-
Se incubează la 37°C timp de 60 minute				timp de 30 minute		
Sol.2,4-dinitrofenilhidrazină, ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Se lasă în repaus 20 minute						
Sol.NaOH 0,4 N, ml	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

După 5 minute se măsoară extincţia probelor (E_P) şi a standardului (E_S) faţă de blancul B, la 520 nm, în cuva de 1 cm.

Calcul

Se calculează concentraţia de piruvat rezultat din reacţia pentru fiecare enzimă în µmoli/min., care se notează cu X.

Pentru GOT: $X = \frac{E_P}{E_S} \cdot 2.10^3.1/60$, adică $X = \frac{E_P}{E_S} \cdot 33,3$

Pentru GPT: $X = \frac{E_P}{E_S} .2.10^3.1/30$, adică $X = \frac{E_P}{E_S} \cdot 66,7$

Se obţine activitatea în Unităţi Internaţionale (µmoli/min /l la 25°C) căutând în tabele de corecţie echivalentul în U.I.al valorii X obţinută:

GOT

X	U.I.	X	U.I	X	U.I.	X	U.I.	X	U.I.
2	2	14	11	24	21	36	33	48	47
4	3	16	13	26	23	38	35	50	51
6	5	18	15	28	25	40	37	52	55
8	6	20	17	30	27	42	39	54	60
10	7	22	19	32	29	44	41		
12	9	23	20	34	31	46	44		

Scanned with OKEN Scanner

GPT							
X	U.I.	X	U.I.	X	U.I.	X	U.I.
2	1	26	9,5	52	22	78	37
4	2	28	10	54	23	80	38
6	2,5	30	11	56	24	82	39
8	3	32	12	58	25	84	40
10	4	34	13	60	26	86	42
12	4,5	36	14	62	27	88	44
14	5	38	15	64	29	90	46
16	6	40	16	66	30	92	48
18	7	42	17	68	31	94	50
20	7,5	44	18	70	33	96	52
22	8	46	19	72	34	98	54
23	8,5	48	20	74	35	100	56
24	9	50	21	76	36	102	60

Observaţii

- Activitatea enzimatică reală nu este dată direct de valoarea obţinută colorimetric, deoarece hidrazona colorată se formează şi cu acidul alfacetoglutaric din substrat, iar pe de altă parte condiţiile nu sunt cele optime (37°C în loc de 25°C şi concentraţia minimă de alfacetoglutarat). S-au calculat tabelele de corecţie prin comparaţie cu datele obţinute cu metoda de referinţă, care exprimă activitatea enzimatică reală, măsurând transformarea $NADH_2$ în NAD^+, în prezenţa enzimelor indicatoare: malat-dehidrogenaza pentru GOT şi lactat-dehidrogenaza pentru GPT.

- Deşi se poate lucra cu curbe de etalonare, stabilite cu diluţii de piruvat, este preferabil să se lucreze cu standard de piruvat la fiecare serie, aşa cum s-a descris.

- Standardului ales (2 mM) corespunde cu 30 U.I. activitate ceea ce permite acoperirea zonei de valori mai des întâlnite (până la 60 U.I.). Dacă activitatea depăşeşte 60 U.I. se va repeta determinarea cu diluarea serului 1/5, iar dacă depăşeşte şi în acest caz valoarea de 60 U.I. se face determinarea cu această diluţie şi cu incubaţie scurtată:

20 minute pentru GOT şi 10 minute pentru GPT.

Scanned with OKEN Scanner

Rezultatele obţinute se vor înmulţi cu 3, corecţia pentru timp şi cu 5, corecţia pentru diluţie.

- Sticlăria utilizată trebuie să fie perfect curată, spălată în final cu multă apă distilată, deoarece urme de detergenţi pot inhiba considerabil activitatea enzimatică.

Valori normale:

GOT: Adulţi 2 - 20 U.I.
Copii sub 3 luni - până la 28 U.I.
Copii 3 luni - 1 an, până la 28 U.I.

GPT: Adulţi 2 - 16,5 U.I.
Copii până la 5 ani, 0,2 - 13 U.I.

Interpretare

In ultimii ani, determinarea activităţii GOT în ser a fost utilizată într-o mare măsură în diagnosticul şi urmărirea evoluţiei unor afecţiuni hepatice şi cardiace.

Determinarea activităţii GPT este mai limitată deoarece originea sa este aproape exclusiv hepatică.

Hepatita acută: în majoritatea cazurilor se produce o creştere a GOT înaintea apariţiei icterului. Valori de 150-500 mU/ml fac foarte probabil diagnosticul de hepatită acută, deşi trebuie avut în vedere diferenţierea faţă de o fază acută a unei boli hepatice cronice sau de o intoxicaţie acută. Nu există hepatită acută fără creşterea activităţii acestor enzime. Activitatea GPT este mai mare decât a GOT în hepatita acută, raportul De Ritis (GOT/GPT = 1,3 în mod normal) fiind sub 1,3 în acest caz. Când hepatita este de tip anicteric creşterea activităţii enzimatice poate fi singurul semn diagnostic.

Boli hepatice cronice: în majoritatea cazurilor activitatea GOT creşte moderat, astfel că trebuie completată cu semnele clinice şi alte teste de laborator. In aceste afecţiuni creşterea activităţii GPT este mică.

Icterul obstructiv: în contrast cu hepatita acută, creşterea activităţii transaminazelor este mică, nivele mai înalte urmând colicilor biliare după care scad rapid.

Infarctul miocardic: activitatea GOT creşte în 95 % din cazuri ajungând la maximum în 24 - 48 ore, iar după 4 - 7 zile revine la normal. Valoarea creşterii poate indica extinderea lezi-

unii (50 - 150 mU/ml). GPT are o activitate scăzută în miocard, dar o creştere la valori mai mari decât GOT, câteva zile după infarct indică o insuficienţă cardiacă dreaptă.

DOZAREA ACTIVITATII AMILAZEI IN SER SI URINA

(Metoda Wohlgemuth)

Principiu

Se determină cantitatea minimă de amilază capabilă să hidrolizeze o cantitate determinată de amidon. Pentru a pune în evidenţă amidonul nehidrolizat după 30 minute la 37°C se foloseşte iodul ca indicator.

Reactivi

1. Sol. NaCl 9 g %o
2. Sol. iod N/50
3. Sol. amidon 1 g %o (preparat extemporaneu)

Modul de lucru

Se iau 10 eprubete introducând apoi în fiecare câte 1 ml soluţie NaCl. Se adaugă 1 ml ser sau urină proaspăt recoltată, în prima eprubetă, se agită, se ia din aceasta 1 ml şi se trece în a doua, se agită. Se procedează astfel până la ultima eprubetă din care se ia 1 ml şi se aruncă, realizând în felul acesta o serie de diluţii consecutive.

In toate eprubetele se adaugă câte 2 ml soluţie amidon, se agită şi se pun la termostat la 37°C timp de 30 de minute. Se răcesc apoi şi se adaugă la fiecare eprubetă câte 2-3 picături de soluţie de iod N/50.

Eprubetele în care amidonul este complet hidrolizat sunt incolore. Acelea în care hidroliza este incompletă au o coloraţie brun roşcată, datorită dextrinelor, iar eprubetele cu soluţie albastră conţin amidon nehidrolizat.

Activitatea amilazei determinată astfel, se exprimă în unităţi Wohlgemuth.

O unitate Wohlgemuth reprezintă cantitatea minimă de amilază capabilă să hidrolizeze 1 mg de amidon în 30 minute la 37°C.

Scanned with OKEN Scanner

Calcul

Nr.eprubetelor	1	2	3	4	5 10
Diluţia	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32 . . . . . 1/1024
U.Wohlgemuth	4	8	16	32	64 2048

Se notează prima eprubetă în care s-a produs hidroliza completă a amidonului, deci acea unde avem o coloraţie albastră violet.

De exemplu eprubeta nr.5, deci în eprubeta nr.4 există cantitate suficientă de amilază pentru a hidroliza 2 mg amidon, adică 2 U.W.

Diluţia în eprubeta nr.4 este 1/16
Dacă în 1/16 ser sau urină se află 2 U.W.
în 1 ml X

$$X = \frac{1.2}{1/16} = 16.2 = 32$$

Deci unităţile Wohlgemuth (U.W.) se calculează înmulţind numitorul fracţiei, care arată diluţia,cu 2.

Valori normale
Amilază ser U.W./ml 16 - 32
Amilază urină U.W./ml 8 - 64
Amilază secreţie pancreatică U.W./ml 256 - 2048.

DOZAREA AMILAZEI IN SER SI URINA
(metoda colorimetrică după Richterich)

Principiu

Activitatea amilazei (E.C.3.2.1.1.) este determinată prin măsurarea colorimetrică a cantităţii de amidon hidrolizată în timp de 30 minute la 37°C, de o cantitate determinată de ser sau urină.

Reactivi:
1. Sol. HCl 0,5 N
2. Sol. tampon colidină - HCl 50 mM; NaCl 50 mM
- apă distilată 250 ml
- sol. colidină (25 ml %o) 250 ml

- HCl 0,5 M 250 ml
- NaCl 2,93 g

Se agită până la omogenizare, se corectează pH-ul cu HCl până la 7,5 şi se completează la 1000 ml cu apă distilată.

3. Reactiv cu iod:

KI	108 mM	18 g
I_2	14 mM	1,8 g

Se dizolvă în puţină apă şi apoi se completează la 1000 ml. In momentul întrebuinţării se diluiază 1:200 cu apă distilată.

4. Substrat amidon 6,2 mM (1,0044 g %o). Se prepară proaspăt. Inainte de lucru se amestecă 1:1 cu tampon.

Modul de lucru

Reactivi	Probă (ml)	Martor (ml)
Sol. tampon-substrat	1	1
HCl 0,5 M	-	0,5
Incubare 5 minute la 37°C		
Ser, urină	0,02	0,02
Incubare 30 minute la 37°C		
HCl 0,5 M	0,5	-
Reactiv iod (dil)	10	10

Se citeşte extincţia după 10 - 120 minute la 560 - 620 nm faţă de apă distilată.

Calcul

$$U.I. = \frac{E_M - E_P}{E_M} \cdot 5\,166$$

O unitate internaţională reprezintă numărul de µmoli/min/ 1000 ml ser sau urină.

Valori normale

Ser: 230 - 273o U.I.

Urină: până la 8 000 U.I.

Observaţii

Greutatea moleculară a colidinei este 121,8, deci se vor dizolva 26 ml %o din care se vor lua 250 ml pentru tampon.

Deoarece în salivă cantitatea de amilază este aproximativ de 700 de ori mai mare decât în ser, se vor face diluţii ale salivei de 1/1000 - 1/2000.

Sucul duodenal se va dilua de 1/10.

Serul poate fi păstrat la rece timp de 10 zile.

Interpretare

Se pot întâlni valori crescute în: pancreatite acute, când creşterea amilazei serice atinge valori maxime până la 30 ore de la debut, iar în pancreatita necrotică până la 72 ore, după care urmează evoluţia bolii. Revenirea la normal precede uneori atenuarea simptomelor clinice.

In pancreatita cronică, activitatea amilazei este mai puţin semnificativă, fiind mărită în faza de acutizare a bolii şi revine la normal după ce episodul acut sau subacut a trecut. In unele contuzii abdominale, existenţa unei activităţi crescute denotă şi o lezare a pancreasului.

Creşterea amilazei serice este însoţită de o creştere a lipazei şi modificări în acelaşi sens a amilazei urinare.

Amilaza urinară creşte în sindroamele acute cum ar fu ulcer perforat, colici vezicule.

Se mai întâlnesc valori crescute ale activităţii amilazei în: carcinomul capului de pancreas, obstrucţii ale intestinului, oreion, hipertiroidism, la 50 % din pacienţii care au făcut tratament cu chlorotiazidă şi de asemenea după administrare de morfină.

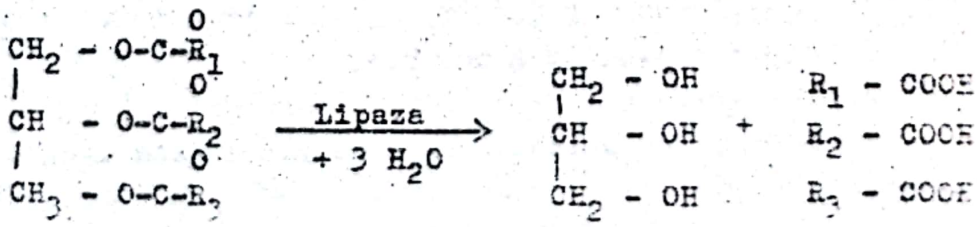
Valori scăzute se întâlnesc : în ciroze, carcinom al ficatului, hepatite, alcoolism.

DOZAREA ACTIVITATII LIPAZEI PANCREATICE

(Tehnica Bondi, Chiray, Lebon)

Principiu

Lipaza pancreatică (E.C.3.1.3.) acţionează asupra grăsimilor neutre, pe care le scindează în glicerină şi acizi graşi:



Reactivi

1. Sol. NaOH N/10
2. Sol. indicator de fenolftaleină 1 %
3. Untdelemn
4. Alcool

Modul de lucru

In următoarele baloane Erlenmeyer se pun:

	Probă (ml)	Martor (ml)
Untdelemn	10	10
Lichid duodenal	2	2
Alcool	-	10
Fenolftaleină indicator	-	1-2 pic.

Se agită. Martorul este titrat imediat cu soluţie de NaOH N/10 până la apariţia unei coloraţii roz-roşii. Proba este ţinută timp de o oră la 37°C, după care se adaugă 10 ml alcool, 1-2 pic. de fenolftaleină şi se titrează cu soluţie de NaOH N/10, până la obţinerea aceleiaţi tente cu a martorului.

Calcul

Activitatea lipazei se exprimă în ml NaOH N/10.

N - N' = nr. ml NaOH N/10 utilizaţi la titrarea acizilor graşi rezultaţi prin acţiunea lipazei dintr-un ml ser.

N = ml NaOH N/10 utilizaţi la titrarea probei;

N'= ml NaOH N/10 utilizaţi la titrarea martorului

Valori normale:

50 - 60 ml NaOH N/10 la 100 ml suc pancreatic.

Interpretare

Valori crescute ale activităţii lipazei pancreatice se întâlneşte în pancreatite, obstrucţii ale canalului pancreatic, în aproximativ 50 % din cazurile de carcinom ale pancreasului, în afecţiuni renale (retenţie de lipază), obstrucţii intestinale şi ulcer duodenal.

Observaţii

Alcoolul are rolul de a împiedica disocierea ulterioară a săpunurilor formate sub influenţa apei din soluţia alcalină; această disociaţie ar provoca virarea fenolftaleinei înainte de neutrali-

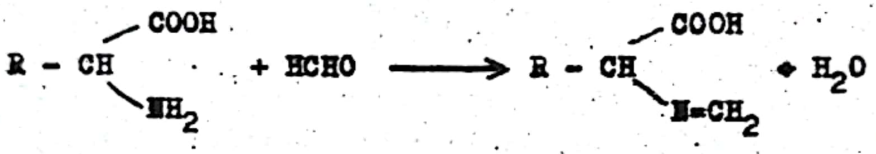
DOZAREA ACTIVITATII TRIPSINEI IN SUCUL PANCREATIC

Principiu

Se dozează, sub acţiunea tripsinei (E.C.3.4.4.), cantitatea de acizi aminaţi eliberaţi de gelatină, timp de o oră la 37°C.

Acizii aminaţi se dozează după metoda formol titrării a lui Sörensen.

Formol titrare constă în blocarea funcţiilor aminice cu formaldehida, având ca rezultat dispariţia bazicităţii acestor grupări şi demascarea aciditătii grupărilor carboxil, care pot fi titrate cu hidroxid de sodiu în prezenţa fenolftaleinei:



Reactivi

1. Sol. gelatină neutralizată:

Se iau 5 g gelatină, se taie mărunt şi se solvă în 100 ml apă distilată. Se încălzeşte uşor până la solvire. Se adaugă apoi 2 picături de fenolftaleină şi se neutralizează cu soluţie de NaOH N/10.

2. Sol. NaOH N/10
3. Sol. indicator de fenolftaleină 1 %
4. Sol. formol 20 %

Modul de lucru:

Intr-un balon Erlenmeyer se măsoară 25 ml soluţie gelatină şi se pune la termostat la 37°C, până când ia temperatura mediului. Se adaugă apoi 1 ml suc pancreatic, se agită şi se introduce din nou la termostat la 37°C, timp de o oră. Se adaugă apoi 1-2 picături de fenolftaleină şi se titrează cu NaOH N/10, până la viraj slab roz. Se adaugă 10 ml sol. formol şi se titrează în continuare cu NaOH N/10, până la viraj roz intens.

Se adună numărul de ml utilizaţi la prima şi a doua titrare. Se notează această sumă cu N.

Se dozează apoi cantitatea de aminoacizi liberi din gelatină. Se iau 25 ml sol. gelatină, se adaugă 1-2 pic. de fenolftaleină şi se titrează cu NaOH N/10 până la viraj roz. Se adaugă apoi 10 ml formol şi se titrează în continuare cu NaOH N/10, până la viraj roz intens. Se notează numărul de ml.de NaOH N/10 cu n.

Calcul

N - n reprezintă activitatea triptică a unui ml suc pancreatic.

Valoarea normală

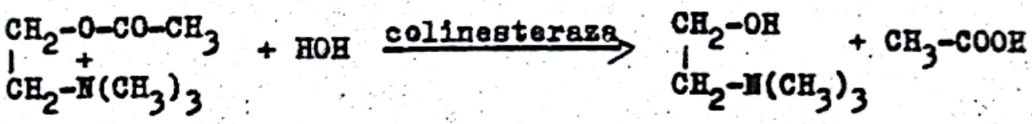
10 ml soluţie NaOH N/10/100 ml suc pancreatic.

DOZAREA ACTIVITATII COLINESTERAZEI SERICE

(Metoda Stedman şi White)

Principiu

Se dozează titrimetric acidul acetic eliberat sub acţiunea colinesterazei asupra acetilcolinei:



Reactivi

1. Sol. extemporanee de acetilcolină 2 %
2. Sol. alcoolică de roşu de crezol 0.04 %
3. Sol. NaOH N/100

Modul de lucru

Intr-un balon Erlenmeyer de 25 ml se pun 19 ml apă bidistilată, 1 ml sol. acetilcolină şi 2-3 picături roşu de crezol.

Se pune pe baia de apă la 38°C. Dacă lichidul ia o culoare galben, înseamnă că există acid acetic eliberat din acetilcolină.

Se lasă să picure din biuretă soluţie de NaOH N/100 până ce lichidul îşi schimbă culoarea de la galben spre violet. Se aşteaptă 10 minute pentru a vedea dacă nu se schimbă culoarea. După acest timp, se adaugă 1 ml ser şi apoi din 5 în 5 minute se titrează cantitatea de acid acetic eliberată din substrat, timp de 20 minute.

Calcul

Activitatea colinesterazei reprezintă numărul de mililitrii de NaOH N/100 folosiţi la cele patru titrări succesive, după adăugarea serului.

Valori normale

Activitatea colinesterazei la 1 ml ser este egală cu 5-8 ml N_aOH N/100.

Interpretare

In unele stări fiziologice cum ar fi a două jumătate a pe-

rioadei de sarcină activitatea colinesterazei este scăzută.

Activitatea colinesterazei scade în hepatitele supraacute, în episoadele grave acute ale cirozei, în cirozele atrofice decompensate şi în metastazele hepatice. Activitatea colinesterazei este corelată cu albuminele.

Scăderi ale colinesterazei se întâlnesc în distrofia musculară, miotonia congenitală Thompson, intoxicaţii cu insecticide organofosforice şi în stările de caşexie tumorală.

Este puternic scăzută în leucemia parablastică acută.

Creşteri ale activităţii serice a colinesterazei se întâlnesc în stări de adipozitate extremă şi în nefroză.

DOZAREA ACTIVITATII FOSFATAZEI ALCALINE IN SER

Principiu

Fosfataza (E.C.3.1.3.1.) catalizează scindarea hidrolitică a esterilor acidului ortofosforic. Se determină cantitatea de fosfor eliberată din β-glicerofosfat de către fosfataza din ser, într-un mediu de tampon de pH=8,6.

Reactivi

1. Sol. iniţială de β-glicerofosfat

β- glicerofosfat de sodiu	1,00 g
barbiturat de sodiu (medinal)	0,85 g
apă distilată	30 ml

Se agită. Se încălzeşte până la completa solvire, se răceşte. Se completează cu apă distilată la 100 ml.

2. Sol.alcalină de lucru pH=8,6

sol.(1) 50 ml + 2,8 ml NaOH N/10, apă distilată până la 100 ml, Se verifică pH-ul.

3. Sol. acid tricloracetic 10 %

4. Sol. acid molibdic

a)	sol. molibdat de amoniu	25 g
	apă distilată	300 ml
b)	sol. acid sulfuric	
	apă distilată	125 ml
	acid sulfuric conc.	75 ml

După solvirea molibdatului şi răcirea soluţiei de acid sulfuric se amestecă soluţiile (a) şi (b) şi se completează la 500 ml cu apă distilată.

5. Sol. acid ascorbic 1 % în HCl N/10

6. Sol. fosfat acid de potasiu (KH_2PO_4) 0,4394 g %o.

Din soluţia concentrată se iau 25 ml şi se diluiază la 500 ml cu apă distilată. 1 ml din această soluţie conţine 0,05 mg fosfor.

Modul de lucru

In următoarele eprubete de reacţie se pipetează:

	Proba activă (ml)	Proba inactivă (ml)	Etalon (ml)
Substrat (sol.2)	1	1	-
Acid tricloracetic	-	1	-
Ser	0.1	0,1	-
Incubare la 37°C timp de o oră			
Acid tricloracetic	1	-	-
Se agită şi apoi se centrifughează (filtrează)			
Supernatant (filtrat)	1	1	-
Etalon	-	-	1
Acid molibdic	0,5	0,5	0,5
Acid ascorbic	0,5	0,5	0,5
Apă distilată	0,5	0,5	0,5

Se agită. Se lasă la întuneric 30 minute. Se citeşte extincţia etalonului (E), a probei active (A) şi a probei inactive (I) la 630 nm.

Calcul

$$\frac{E_A - E_I}{E_E} \times 0{,}05 \times 2000 = \frac{E_A - E_I}{E_E} \times 100 =$$

= mg P/h/100 ml

Valori normale

Unităţi Bodansky: 1 mg/h/100 ml

Adulţi:	2 - 4 U.B.	20 - 40 mU/ml
Copii:	5 - 15 U.B.	38 - 138 mU/ml

Transformarea unităţilor Bodansky în mU/ml se face înmulţind cu 5,4 provine din:

$$\mu mol = \frac{\mu g \times 1000}{G.M.} = \frac{1000\ ug \times 1000}{31} = \mu\ moli/h/l$$

$$1\ \mu mol\ P/min/ml = \frac{1000\ \mu g \times 1000}{31 \times 60 \times 100} = 5{,}4$$

mg P/h/100 x 5,4 = mU

Interpretare

Bolile şi perturbările funcţionale ale osului rămân încă principala aplicare a fosfatazei alcaline.

Fosfataza alcalină este originară din osteoblaştii osului (şi parţial din osteoblaşti). Din os ea trece în plasmă şi este excretată prin bilă. Prin urmare, în absenţa bolilor hepatobiliare schimbările în valoarea enzimei în ser sunt în directă legătură cu activitatea osteoblaştilor.

In timpul copilăriei, fosfataza alcalină din ser corespunde cu viteza de creştere a osului.

Există o creştere a activităţii enzimei în ser în unele boli implicând creşterea activităţii osteoblaştilor.

Creşterea fosfatazei alcaline este singura schimbare chimică caracteristică bolii Paget în care Ca^{++} seric şi fosforul anorganic rămân în limite normale. Valori de 140-400-800 mU/ml până la 1400 mU/ml s-au găsit în diferite stadii ale bolii.

Un ajutor în diagnosticul diferenţial al carcinomului de prostată cu metastază în care se găseşte o creştere a activităţii fosfatazei alcaline este asigurată prin determinarea simultană a fosfatazei acide care arată o activitate înaltă în carcinomul cu metastază a prostatei, dar numai o uşoară creştere în boala Paget.

Creşterea activităţii fosfatazei alcaline (150 - 1000 mU/m este considerată a fi cel sensibil şi sigur criteriu a rahitismului. La mai mult de o lună şi jumătate înainte ca boala să se manifeste clinic, se poate detecta o creştere a fosfatazei alcaline în ser.

Inceperea scăderii nivelului enzimei din ser după tratamentul cu vitamina D este indicaţie a începerii procesului de vindecare.

In hiperparatiroidism nivelul fosfatazei alcaline poate creşte până la 500 mU/ml, dar nu înainte de a se produce schimbări extensive la nivelul scheletului.

Deşi valoarea medie a fosfatazei alcaline în acest caz este mai mică decât în boala Paget, diagnosticul diferenţial este mai ales dependent de hipercalcemia şi hipofosfatemia găsită în hiperparatiroidism.

Fosfataza alcalina treptat revine la normal după îndepărta-

rea chirurgicală a adenomului paratiroidian.

Activitatea fosfatazei alcaline este în jurul limitei superioare a normalului în timpul regenerării după fracturi osoase şi numai ocazional este uşor crescută.

Valori normale se găsesc de asemenea în osteoporoză; în astfel de cazuri o creştere netă indică o asociere a osteomalaciei.

In cazul tumorilor osoase, o activitate fosfatazică înaltă s-a găsit în special în osteosarcom (o creştere de 20 - 40 ori faţă de normal) şi de asemenea în carcinomul de prostată cu metastază osoasă.

Valori normale se găsesc în tumori benigne ale scheletului.

O creştere a activităţii fosfatazei alcaline în ser, în prezenţa unei tumori maligne, poate fi privită ca un semn sigur a unei metastaze osoase, cu condiţia ca o metastază la ficat să fie exclusă.

Boli ale sistemului hepato-biliar

O creştere a fosfatazei alcaline din ser se poate produce în obstrucţii biliare. Gradul obstrucţiei intrahepatice biliare, care însoţeşte alterarea parenchimului hepatic, poate fi apreciat prin măsurarea simultană a transaminazei şi fosfatazei alcaline.

Cea mai frecventă aplicare a determinării fosfatazei alcaline este în icterele obstructive, când creşterea marcată este în contrast cu creşterea uşoară a transaminazei.

Creşterea persistentă a activităţii fosfatazei alcaline este de asemenea observată în bolile cu metastază a ficatului.

DOZAREA ACTIVITATII FOSFATAZEI ACIDE IN SER

Principiu

Principiul determinării este acelaşi ca şi pentru fosfataza alcalină, însă substratul care se prepară este acid cu un pH de 4,5 - 4,9.

Reactivi:

1. Sol. normală de acid acetic 60 ml %
2. Sol. iniţială de β-glicerofosfat de sodiu (vezi fosfataza alcalină).
3. Sol. acidă de lucru pH = 4,5 - 4,9
   Sol. (2) 50 ml + 5 ml sol. N acid acetic, apă distilată până la 100 ml.
4. Reactivii necesari pentru dozarea fosforului

(vezi fosfataza alcalină)

Modul de lucru

In următoarele eprubete de reacţie se pipetează:

	Proba activă (ml)	Proba inactivă (ml)	Etalon (ml)
Substrat (3)	1	1	-
Acid tricloracetic	-	1	-
Ser	0,1	0,1	-
Incubare la 37°C timp de o oră			
Acid triclor acetic	1	-	-
Se agită şi se centrifughează (filtrează)			
Supernatant (filtrat)	1	1	-
Etalon	-	-	1
Acid molibdic	0,5	0,5	0,5
Acid ascorbic	0,5	0,5	0,5
Apă diatilată	0,5	0,5	0,5

Se agită, se lasă la întuneric 30 minute. Se citeşte densitatea optică a etalonului E, a probei active A şi a probei inactive I la 630 nm.

Calcul

$$\frac{E_A - E_I}{E_E} \times 0,05 \times 2000 = \frac{E_A - E_I}{E_E} \times 100 = \text{mg P/h/100 ml}$$

Valori normale

Adulţi: 0,05 - 0,10 U.B.

Copii: 0,20 - 0,80 U.B.

Interpretare

Fosfataza acidă în ser este provenită din surse: splină, rinichi, eritrocite, trombocite.

Porţiunea prostatică este mică la indivizii normali. Activitatea fosfatazei acide prostatice poate fi specific inhibată prin adăugarea de L-tartrat la amestecul de reacţie, dând astfel posibilitatea de a diferenţia diferitele tipuri de fosfatază acidă.

Carcinomul de prostată

O creştere moderată în activitatea fosfatazei acide sugerează prezenţa unui carcinom de prostată. Totuşi, acest indicator nu este atât de sensibil. O creştere semnificativă a nivelului fosfatazei acide este de obicei găsită numai în carcinomul de prostată cu metastază.

Boli neoplastice

Boala Paget şi metastazele la os şi ficat, din carcinomul de sân cauzează o creştere semnificativă a activităţii fosfatazei acide.

DOZAREA ACTIVITATII ALDOLAZEI IN SER

Principiu

Aldolaza (Fructozo-1,6-difosfat-aldolaza -(E.C.4.1.2.7.) catalizează reacţia de scindare a fructozo-1,6-difosfatului în doi triozfosfaţi:

Fructozo-1,6-difosfat ——→ Dihidroxiaceton-fosfat + + D-gliceralaldehid fosfat

Sulfatul de hidrazină introdus în mediul de reacţie, împiedică transformarea triozfosfaţilor de către alte enzime existente în ser. Triozfosfaţii sunt hidrolizaţi în mediu alcalin, iar triozele astfel eliberate reacţionează cu 2,4-dinitrofenilhidrazina cu formare de hidrazone colorate în roşu-brun.

Reactivi

1. Sol. tampon colidină

colidină	1,3 ml
HCl până la pH=7,4	
apă distilată	la 100 ml

In locul colidinei se poate utiliza piridină (1 ml %o, se ajustează la pH=7,4 cu NaOH 0,75 N).

2. Sulfat de hidrazină 7,3 g
   NaOH 0,75 N 70-80 ml (până la pH=7,4)
   Apă distilată la 100 ml

3. Sol. acid monoiodacetic M/500

Acid monoiodacetic	0,037 g
Apă distilată	50 ml
NaOH 0,75 N până la pH=7,4	
Apă distilată până la 100 ml	

4. Sol. 2,4-dinitrofenilhidrazină

2,4-dinitrofenilhidrazină	0,1 g
HCl 2 N (20 ml HCl conc.+ 80 ml apă distilată)	100 ml

5. Sol. fructozo-1,6-difosfat de Na 0,02 M

Intr-o eprubetă de centrifugă se introduc 270 mg fructozo-1,6-difosfat de Na_8, se dizolvă în 5 ml HCl 1 N. Se adaugă 3,5 ml sol. sulfat de sodiu 1 M, se centrifughează şi superna-

tantul se controlează prin adăugarea unei picături de sulfat de Na. După depunerea totală a bariului, supernatantul este trecut într-un balon cotat de 25 ml. Se alcalinizează cu NaOH 0,75 până la pH=7,4 şi se completează la semn cu apă distilată. Soluţia se păstrează la +4°C, cu câteva picături de toluol, timp de 2-3 săptămâni.

6. Sol. acid tricloracetic 10%

7. Sol. NaOH 0,75 M.

Modul de lucru

	Proba activă (ml)	Proba inactivă (ml)
Ser	0,5	0,5
Tampon	0,5	0,5
Amestec sulfat de hidrazină, acid monoiodacetic, apă dist.(1:1:1)	0,4	0,4
Fructozo-1,6-difosfat	0,125	0,125
Incubare la 37°C timp de o oră		
Acid tricloracetic	1,5	1,5
F-1,6-DP	-	0,125

Se lasă în repaus 10 min., se centrifughează sau se filtrează.

In alte eprubete se introduc:

Filtrat (supernatant)	0,5	0,5
NaOH	0,5	0,5
Se lasă 10 minute la temperatura camerei.		
2,4-DNPH	0,5	0,5
Se lasă 10 minute la 37°C		
NaOH	3,5	3,5

După 10 minute se citeşte extincţia probei active (A) şi a probei inactive (I), faţă de apă distilată, la 530 nm în cuva de 1 cm.

Calcul

$$(E_A - E_I) \cdot 100 = \text{cifra aldolazei}$$

Valori normale:

Ser: 3 - 15

Interpretare

Deoarece cea mai mare cantitate de aldolază se găseşte în muşchiul scheletic, determinarea ei are importanţă particulară în diagnosticul bolilor musculare.

Boli musculare

In crizele mioglobinurice, aldolaza serică creşte de 100 ori valoarea normală şi scăderea treptată a activităţii poate fi un indicator al remisiunii.

Distrofia musculară progresivă

In această afecţiune are loc o creştere a activităţii aldolazei din ser, ajungând uneori la valori de 10 ori mai mari decât cea normală, în timp ce activitatea enzimei din muşchi scade la 1/3 din valoarea iniţială. Creşterea activităţii din ser este mai pronunţată la începutul bolii, deseori chiar înaintea apariţiei simptomelor clinice.

O creştere marcantă a activităţii aldolazei serice se întâlneşte în dermato-miozite.

Infarct cardiac

O creştere a activităţii aldolazei serice are loc în primele 12 ore de la accident şi revine la normal mai încet decât creatin-fosfokinaza (CPK) şi GOT, permiţând confirmarea diagnosticului şi la câteva zile de la episodul acut.

Boli de ficat

In hepatita acută are loc o creştere marcantă a activităţ aldolazei serice (chiar până la o valoare de 10 ori mai mare faţă de cea normală).

In ciroza hepatică sau obstrucţia căilor biliare nu se prc duce o creştere a activităţii aldolazei serice.

Scanned with OKEN Scanner

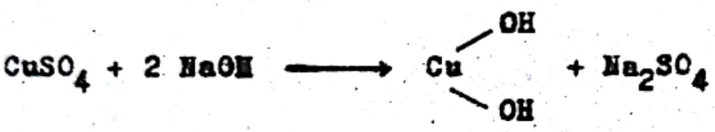
GLUCIDE

REACTII CALITATIVE ALE GLUCIDELOR

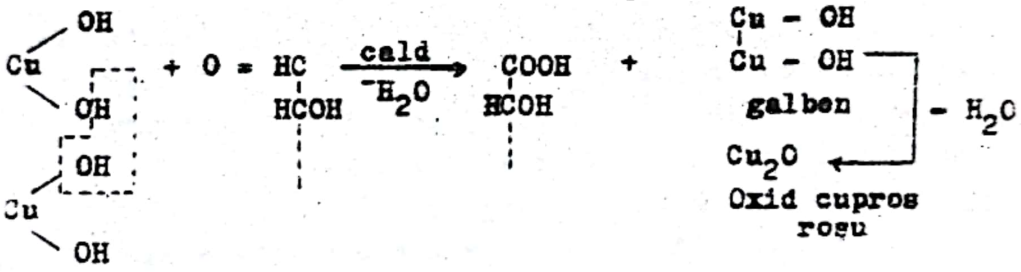
I. **Reacţii de reducere**

1. **Reacţia Fehling**

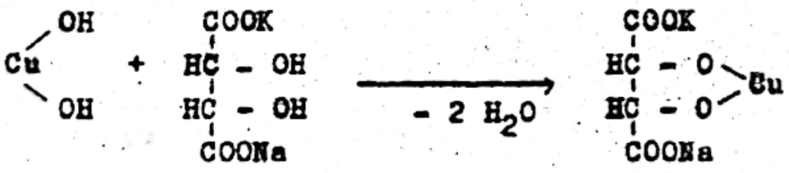
Sărurile de cupru (Cu^{2+}) de culoare albastră, în mediu alcalin, la fierbere, sunt reduse de către monozaharidele reducătoare la Cu_2O (oxid cupros), care se separă ca un precipitat de culoare roşie-cărămizie:



hidroxid cupric



Deoarece excesul de hidroxid cupric, neredus, se deshidratează la cald în oxid de cupru negru, care deranjează reacţia. $Cu(OH)_2$ se complexează cu tartrat dublu de Na şi K:



complex tartro-cupric

Reactivi

1. Sol. Fehling I
   - $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 35 g
   - H_2SO_4 conc. 5 ml
   - Apă distilată 1000 ml
2. Sol. Fehling II
   - NaOH 30 g % 300 ml
   - Tartrat dublu de Na şi K 150 g

- Apă distilată până la 1000 ml

In momentul întrebuinţării se amestecă în părţi egale.

Modul de lucru

Intr-o eprubetă se pipetează 5 ml soluţie glucoză sau urina de analizat şi 2 ml din amestecul Fehling I şi Fehling II. Se agită şi se încălzeşte eprubeta într-o baie de apă. Va apare un precipitat care indică prezenţa glucozei.

2. Reacţia Benedict

Principiu

Reacţia se bazează tot pe reducerea cuprului, o variantă a reacţiei Fehling. Pentru solvirea precipitatului de $Cu(OH)_2$ se utilizează însă citratul de sodiu.

Reactivi

1.	Citrat de sodiu	85 g
	Carbonat de sodiu	50 g
	Apă distilată	400 ml
2.	Sulfat de cupru cu 5 H_2O	8,5 g
	Apă distilată	50 ml

Se amestecă cele două soluţii şi se completează, în balon cotat la 500 ml, cu apă bidistilată. Dacă soluţia nu este limpede, se filtrează.

Modul de lucru

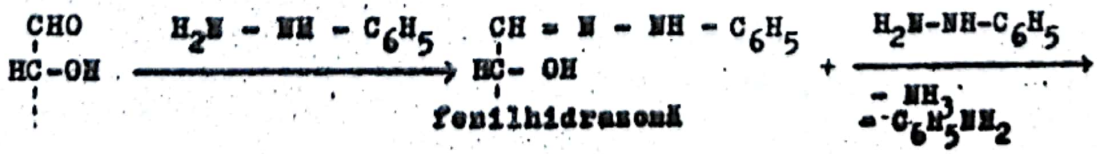
Intr-o eprubetă se pipetează 5 ml soluţie Benedict şi 8-10 picături din soluţia care conţine glucoză. Se fierbe 5 minute la baia de apă. Existenţa glucozei este dovedită prin apariţia unui precipitat a cărui culoare ne va indica şi cantitatea aproximativă a glucozei din soluţia de analizat:

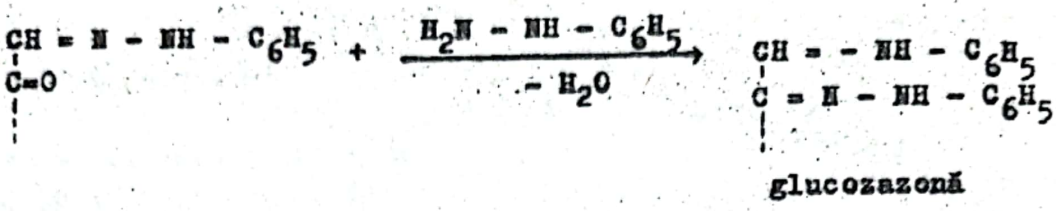
- opalescenţă verde: până la 1 g %o
- precipitat galben: până la 10-20 g %o
- precipitat roşu-cărămiziu: peste 20 g %o.

II. Reacţii de diferenţiere

1. Formarea osazonelor (reacţia cu fenilhidrazină).

Monozaharidele formează cu fenilhidrazina în mediu acid, compuşi numiţi osazone, care au aspectul unor cristale de culoare galbenă sau galben-portocaliu, greu solubile:





glucozazonă

Glucoza, manoza, fructoza sau riboza şi arabinoza, formează aceleaşi osazone, care pot fi recunoscute prin examinarea cristalelor la microscop.

Reactivi

1. Sol. de fenilhidrazină - acetat de sodiu:
   - acetat de sodiu crist. 20 g
   - clorhidrat de fenilhidrazină 15 g
   - apă distilată 80 ml

Soluţia trebuie să fie limpede şi se prepară extemporaneu.

2. Sol. monozaharid 10 % (glucoză, arabinoză, galactoză, maltoză, lactoză).

3. Urină pentru analiză.

Modul de lucru

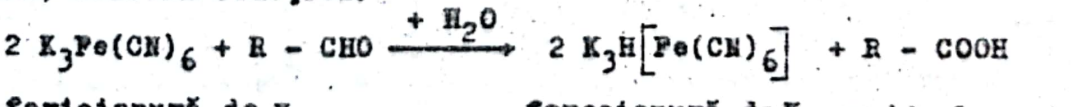
Se introduce în eprubetă câte 1 ml soluţie 10 % monozaharid. Se adaugă 3 ml soluţie fenilhidrazină-acetat de sodiu şi se menţine pe baie de apă 20-30 minute. Se lasă să se răcească fără a agita eprubetele. Fiecare oză formează cristale de osazonă, care se diferenţiază la microscop după forma cristalelor (ace grupate în mănunchiuri, rozete, crenguţe de brad etc.). In acelaşi mod se procedează şi cu urina de analizat.

DOZAREA GLUCOZEI IN SANGE
(Metoda Hagedorn-Jensen)

Principiu

Proteinele existente în sange sunt precipitate la cald cu hidroxid de zinc obţinut prin reacţia între sulfatul de zinc şi hidroxidul de sodiu şi separate apoi prin filtrare:

Glucoza prezentă în filtratul astfel defecat, va reduce în soluţie alcalină, prin fierbere, fericianura de potasiu la ferocianură, conform reacţiei:



fericianură de K ferocianură de K acid gluconic

Soluţia de fericianură de potasiu conţinând şi carbonat de sodiu, are loc o reacţie de neutralizare:

$$K_3H[Fe(CN)_6] + Na_2CO_3 \longrightarrow \underset{\text{ferocianură de sodiu şi potasiu}}{K_3Na[Fe(CN)_6]} + NaHCO_3$$

Ferocianura rezultată este apoi precipitată cu $ZnSO_4$, pentru a nu disocia înapoi în fericianură, formînd astfel un complex insolubil:

$$2\ K_3Na[Fe(CN)_6] + 3\ ZnSO_4 \longrightarrow K_2Zn_3[Fe(CN)_6] + 2\ K_2SO_4 + Na_2SO_4$$

Excesul de fericianură, care nu a fost redus de glucoză, este redusă apoi cantitativ de KI în mediu acid, eliberând o cantitate echivalentă de iod:

$$2\ K_3[Fe(CN)_6] + 2\ KI + 2\ CH_3COOH \longrightarrow I_2 + K_3H[Fe(CN)_6] + 2\ CH_3COOK$$

Ferocianura este transformată în complex $K_2Zn_3[Fe(CN)_6]$, iar iodul eliberat este titrat în final cu tiosulfat de sodiu, în prezenţa amidonului ca indicator:

$$I_2 + 2\ Na_2S_2O_3 \longrightarrow 2\ NaI + Na_2S_4O_6$$

Reactivi

1. Sol. NaOH N/10
2. Sol. sulfat de Zn 0,43 g %
3. Sol. acid acetic 2 g %
4. Sol. fericianură de potasiu N/200
   - fericianură de potasiu 1,65 g
   - carbonat de sodiu anh. 10,60 g
   - apă distilată până la 1000 ml

In lipsă de carbonat de sodiu anhidru, se poate utiliza carbonat de sodiu cristalizat în cantitate de 28,6 g.

5. Sol. iode-zincică
   - iodură de potasiu 2,5 g
   - sulfat de zinc 5 g
   - clorură de sodiu 25 g
   - apă distilată până la 100 ml
6. Sol. amidon indicator

Se solvă 27 g clorură de sodiu şi se încălzeşte până la fierbere. Se adaugă 1 g amidon antrenat cu 5 ml apă distilată

rece. Se continuă fierberea până la clarificare. Se răcește. Se filtrează și se completează cu apă distilată la 100 ml.

7. Sol. iodat de potasiu N/200
   Se solvă 0,3566 g iodat de potasiu în 2000 ml apă distilată
8. Sol. tiosulfat de sodiu N/200

Modul de lucru

In trei eprubete se pipetează:

	Proba 1 (ml)	Proba 2 (ml)	Martor (ml)
Sulfat de zinc	5	5	5
Hidroxid de sodiu	1	1	1
Sânge total	0,1	0,1	-

Se țin eprubetele 3 minute în baia de apă, din momentul în care apa începe să fiarbă. Se filtrează cantitativ prin vată conținutul celor trei eprubete. Filtrarea prin vată se va face astfel:

Eprubetele de glicemie Hagedorn vor fi prevăzute cu câte o pâlnie mică, cu o bucățică de vată care servește drept filtru și o baghetă de sticlă.

Pâlnia, vata, bagheta și eprubetele se vor spăla de 3 ori cu apă distilată fierbinte pentru a îndepărta eventualele impurități și restul de glucoză de la determinările anterioare, care ar putea influența reacția.

Se filtrează apoi conținutul celor 3 eprubete de defecare, decantând pe baghetă. După filtrare, în eprubetele de defecare se introduc câte 2 ml apă distilată fierbinte, se clătește și se aduce conținutul în pâlnie. Se repetă operația de 2 ori pentru a antrena în eprubeta Hagedorn toată glucoza.

In eprubetele Hagedorn se mai adaugă:

	Proba 1 (ml)	Proba 2 (ml)	Martor (ml)
Fericianură de potasiu	2	2	2

Se pun din nou eprubetele la baia de apă care fierbe, timp de 15 minute. Se răcesc, apoi se adaugă:

Sol. iodo-zincică	3	3	3
Acid acetic	2	2	2
Amidon (picături)	3	3	3

Se titrează iodul rezultat cu tiosulfat de sodiu N/200 până la decolorare. Dacă soluția de tiosulfat de sodiu nu este

exact N/200, se determină înaintea probelor factorul de corecţie (martorul rece).

Intr-o eprubetă se pipetează:

- Iodat de potasiu 2 ml
- Sol. iodo-zincica 3 ml
- Acid acetic 2 ml

Se titrează cu tiosulfat de sodiu până la galben pai, apoi se adaugă 2-3 picături de amidon şi se continuă titrarea până la decolorare.

Dacă soluţia este exact N/200 se utilizează până la decolorare 2 ml tiosulfat de sodiu; dacă nu, determinăm factorul de corecţie după formula:

$$F = \frac{2}{n}$$

în care n = numărul de ml de tiosulfat de sodiu întrebuinţaţi.

Cu acest factor vom înmulţi numărul de ml de tiosulfat de sodiu utilizaţi la titrarea probelor şi a martorului cald, pentru a avea tiosulfat de sodiu exact N/200, pentru a putea folosi la calcul tabelul Hagedorn-Jensen.

Calcul

Se face media aritmetică a numărului de ml de tiosulfat de sodiu folosiţi la titrarea probelor cu sânge. Se înmulţeşte numărul de ml de tiosulfat de sodiu, rezultaţi din media probelor, cât şi numărul de ml de tiosulfat de sodiu ai martorului alb cu factorul F. Se citeşte cantitatea de glucoză din tabel, corespunzătoare în g ‰ atât pentru martorul alb, cât şi pentru media probelor cu sânge.

Citirea în tabel se face astfe: prima coloană verticală indică cantitatea de tiosulfat de sodiu în ml, iar prima coloană orizontală, sutimi de ml utilizaţi. In celelalte coloane verticale este indicată cantitatea de glucoză corespunzătoare în g ‰.

Rezultatul obţinut prin scăderea cantităţii de glucoză, corespunzătoare martorului alb, din cea a sangelui, ne indică cantitatea de glucoză în g ‰.

Valori de referinţă

1 ∓ 0,1 g glucoză ‰ ml sânge.

Observaţii

Martorul alb este necesar pentru a cunoaşte cantitatea de fericianură redusă de însăşi reactivii folosiţi în reacţie.

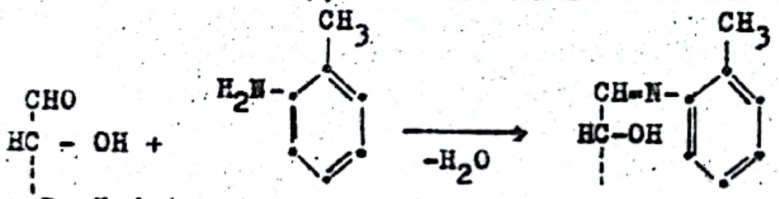
Diferenţa la titrare dintre cele două probe cu sânge nu trebuie să depăşească 0,05 ml tiosulfat de sodiu.

Fericianura de potasiu trebuie să fie chimic pură, în caz contrar ea nu este redusă de glucoză. Pentru verificarea calităţii reactivului se face o determinare cu soluţie de glucoză etalon 1 ‰. In caz că reducerea nu este completă, fericianura de potasiu trebuie recristalizată sau după adăugarea reactivului se mai adaugă 1 ml hidroxid de sodiu 0,1 N.

DOZAREA GLUCOZEI DIN LICHIDELE BIOLOGICE PRIN METODA CU ORTO-TOLUIDINA

Principiu

Glucoza formează cu o- toluidina (2-amino-toluenul) în mediu de acid acetic la cald, un produs de condensare de culoare bleu-verde (bază Schiff), care are maximum de absorbţie la 630 nm.



Dacă determinarea se face pe ser, acesta trebuie să fie clar, nehemolizat şi cu un conţinut scăzut de lipide.

Reactivi

1. Acid tricloracetic 10 %
2. Sol. acid benzoic în apă distilată fierbinte 0,2 g %
3. Sol. etalon glucoză 0,1 % în acid benzoic:
   - glucoză 1 g
   - sol. acid benzoic 100 ml

   Se diluiază în momentul întrebuinţării 1/10 în soluţie de acid benzoic.
4. Sol. orto-toluidină 6 g % în acid acetic glacial
   - tiouree 0,15 g
   - o-toluidină 6 ml
   - Acid acetic glacial 100 ml

Modul de lucru

Metoda cu deproteinizare.

In trei eprubete se pipetează:

	P (ml)	E (ml)	M (ml)
Apă bidistilată	1,3	1,3	1,5
Ser, LCR, urină	0,2	-	-
Etalon glucoză dil.1/10	-	0,2	-
Acid tricloracetic 10%	0,5	0,5	0,5
Se agită şi se centrifughează proba			
Supernatant probă	0,5	-	-
Amestec etalon	-	0,5	-
Amestec martor	-	-	0,5
Sol. o-toluidină	2,0	2,0	2,0

Se agită. Toate trei eprubetele se astupă cu dop de vată şi se ţin pe baia de apă la fierbere, timp de 10 minute. Se răcesc în curent de apă rece. Se citesc extincţiile la 630 nm.

Calcul

$$\frac{E_P}{E_E} \times 1 = \text{g glucoză \%o ml ser}$$

Valori de referinţă

Ser: 0,70 - 0,90 g %o ml ser (cu deproteinizare)

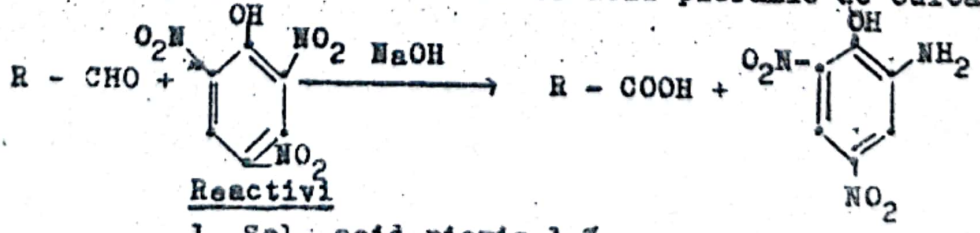
DOZAREA GLUCIDELOR URINARE
(Metoda Ionescu - Matiu)

Principiu

Glucoza, în mediu alcalin reduce cantitativ fericianura de potasiu la ferocianură:

$$K_3Fe(CN)_6 + \text{glucoză} \xrightarrow{+ H_2O} 2\,K_3H[Fe(CN)_6] + \text{acid gluconic}$$

Când întreaga cantitate de fericianură de potasiu a fost redusă la ferocianură, glucoza va reacţiona cu acidul picric în mediu de reacţie, care este redus la acid picramic de culoare roşie



Reactivi

1. Sol. acid picric 1 %
2. Sol. etalon glucoză 5 g %o

3. Reactiv fericianic:

Sol. A:	fericianură de potasiu	48 g
	apă distilată	400 ml
Sol. B:	NaOH	48 g
	apă distilată	400 ml

Se amestecă soluţiile A şi B şi se completează cu apă distilată la 1000 ml.

4. Reactiv Courtonne:

acetat bazic de plumb	300 g ‰

După solvire se adaugă acid acetic glacial până la reacţie neutră.

Modul de lucru:

Fiziologic, prin urină nu se elimină glucoză, din care cauză se cercetează mai întâi prezenţa ei printr-o reacţie de recunoaştere: Benedict, Fehling etc. Dacă reacţia este pozitivă se trece la dozarea glucozei.

Se determină densitatea urinii cu ajutorul urodensimetrului. Se defecă urina cu reactiv Courtonne: la 9 ml de urină se adaugă 1 ml reactiv Courtonne, se agită şi se filtrează. Filtratul este utilizat pentru dozarea glucozei, diluându-se după cum urmează, în funcţie de densitatea urinii nedefecate:

Densitate	Diluţie
1015 - 1017	-
1020	1/2
1025	1/5
1030	1/10

In două baloane Erlenmeyer de 100 ml se introduc:

	Probă (ml)	Etalon (ml)
Apă distilată	20	20
Reactiv fericianic	5	5
Acid picric (picături)	5	5

Baloanele se încălzesc direct pe sita de asbest la flacăra unui bec de gaz şi la fierbere se titrează: proba cu filtrat, iar etalonul, cu soluţie etalon de glucoză 5 ‰. Se notează numărul de ml de sol. etalon de glucoză utilizaţi cu N, iar numărul de ml de filtrat cu n.

Calcul

Ex.: N=2,5; n=4

1000 ml sol.et. . . . . 5 g glucoză

2,5 x

$$x = \frac{2,5 \cdot 5}{1000} = 0,0125 \text{ g glucoză}$$

0,0125 g . . . . . 4 ml filtrat urină

y . . . . . 1000 ml filtrat urină

$$y = \frac{0,0125 \cdot 1000}{4} = 3,12 \text{ g \%o ml filtrat}$$

Pentru a afla cantitatea de glucoză din 1000 ml urină, la rezultatul obţinut se adaugă 1/10 din valoarea lui din cauza diluţiei intervenită prin defecare.

3,12 + 0,312 = 3,432 g %o

Dacă urina a fost diluată, se înmulţeşte rezultatul cu diluţia.

Observaţii

Este necesară defecarea urinii deoarece conţine şi alţi compuşi reducători (acid uric, creatinină, acid ascorbic, proteine, nucleoproteine, acid glicuronic şi glicuronoconjugaţi ai unor medicamente ca penicilina, dihidrostreptomicina, PAS, acid salicilic, aspirină, piramidon, antipirină etc.) care pot da reacţia fals pozitivă.

Interpretare

Determinarea cantitativă a glucozei sanguine, reprezintă cea mai importantă metodă pentru studiul metabolismului glucidic.

Până la nivelul glicemiei care nu depăşeşte pragul renal de eliminare al glucozei (1,7-1,8 g %o ml sânge venos), singura cale de utilizare a glucozei sanguine este calea anabolică sau catabolică. Eliminarea glucozei prin urină (glicozuria) intervine doar în condiţii nefiziologice (diabet, hipertrofia tubilor renali, hipertiroidism), ca o supapă pentru îndepărtarea excesului de glucoză din spaţiul extracelular.

Variaţiile fiziologice ale glicemiei se pot manifesta prin hipoglicemie, ca în inaniţie şi prin hiperglicemie, ca în excesul de încărcare a organismului cu glucide (hiperglicemia alimentară).

Hiperglicemii patologice întâlnim în infecţii cu oxid de carbon, cafeină, accidente cerebrovasculare şi în special în diabet. In această boală determinarea glicemiei este în general folosită şi ca un indicator al eficacităţii terapeutice cât şi pentru urmărirea evoluţiei bolii.

Hipoglicemii patologice pot fi întâlnite după administrare mare de doze de insulină sau în carcinomul insulelor lui Langerhans.

Stările de hipoglicemie determină apariţia de diferite accidente ca:indispoziţii, ameţeli, somnolenţă, tahicardie, cefalee.

In general,hipoglicemia între 0,75 - 0,65 g %o dă accidente uşoare, între 0,65 - 0,50 accidente medii iar sub 0,50 g %o tulburări cu comă.

Glicozuria

In urina normală se elimină zilnic o cantitate de zaharuri reducătoare care nu depăşeşte 50 mg şi nu influenţează metodele biochimice obişnuite de decelare.

Unele substanţe reducătoare prezente în urină pot da reacţii fals pozitive, deobicei slabe, de aceea, decelarea unor cantităţi crescute de substanţe reducătoare în urină indică de cele mai multe ori prezenţa glucozei.

Glicozuria poate indica un diabet renal simplu, o nefropatie dobândită (glomerulonefrită, nefroscleroză, sau nefroză) o nefropatie congenitală (sindromul Toni-Dobre-Franconi). Glicozuriile renale sunt caracterizate prin scăderea pragului renal de eliminare, iar glicemia şi curba de hiperglicemie pot fi normale.

Cel mai adesea însă, glicozuriile se datoresc depăşirii capacităţii maxime de resorbţie tubulară a glucozei din cauza hiperglicemiei (1,7 g %o). Această tulburare poate fi tranzitorie sau permanentă.

Dintre glicozuriile tranzitorii pot fi menţionate cele postprandiale (extrem de rare), gravidice (15-25 % din gravide prezintă o glicozurie uşoară în ultimul trimestru de sarcină), precum şi cele care însoţesc agresiunile violente (traumatismele, intervenţii chirurgicale, infecţii acute, pancreatonecroze grave, infarct miocardic, leziuni cerebrale, diverse intoxicaţii etc.).

Glicozuriile permanente sunt determinate de hiperfuncţia unor glande endocrine aparţinând sistemului hiperglicemiant (ante-

hipofiza, suprarenalele, tiroida) dar mai ales insuficienței insulinice severe caracteristică diabetului zaharat manifest. Glicozuria diabetică, deși consecință a hiperglicemiei, nu depinde exclusiv de acest factor și de aceea nu se poate stabili o relație matematică între nivelul hiperglicemiei și cantitatea de glucoză eliminată zilnic în urină.

Termenul de glicozurie utilizat în mod curent în clinică este incorect. El trebuie înlocuit cu termenul de "meliturie", care reprezintă prezența unui corp reducător glucidic în urină și care este pus de regulă în evidență prin reacția Fehling, Benedict, reacții nespecifice.

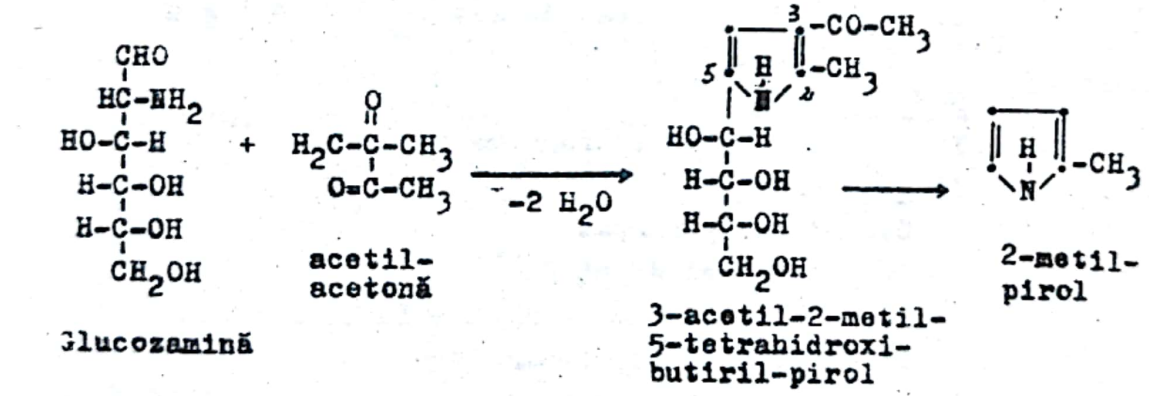
Pentru glicozurie, galactozurie etc., este necesar a se folosi reacții de diferențiere.

Vitamina C, acidul uric, dau reacții pozitive cu reactivii Fehling, Benedict, ceea ce impune o defecare prealabilă cu reactiv Courtonne.

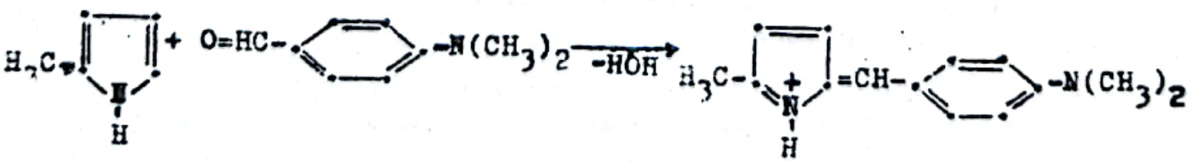
DOZAREA HEXOZAMINELOR IN SER

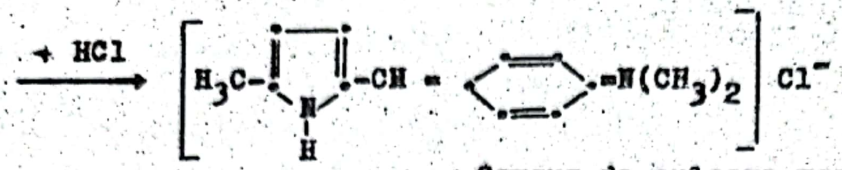
Principiu

Hexozaminele (glucozamina și galactozamina), în mediu alcalin și în prezența acetilacetonei, formează un derivat pirolic:



Derivatul pirolic, formează în prezența p-dimetil-aminobenzaldehidei, în mediu acid, un compus (II) de culoare roz, care se colorimetrează la 530 nm:





Compus de culoare roz

Reactivi necesari

1. Alcool etilic 95 %
2. Sol. acid clorhidric 3 N
3. Sol. NaOH 3 N
4. Sol. acetil-acetonă:
   - acetil-acetonă 2 ml
   - Na_2CO_3 0,5 N până la 100 ml
   Se prepară în momentul utilizării.
5. Sol. Na_2CO_3 0,5 N
6. Reactiv cromogen (EHRLICH):
   - p-dimetilaminobenzaldehidă 0,8 g
   - metanol 30 ml
   - HCl conc. 30 ml
7. Sol. etalon de glucozamină 5 mg %
8. Sol. indicator roşu de metil: 0,1 g %
   (în alcool 60 %)

Mod de lucru

In eprubete de centrifugă se face:

A) Defecarea:

0,1 ml ser proaspăt
0,5 ml alcool de 95 %
Se centrifughează 10 minute la 3000 t/min.
Se decantează supernatantul
- peste precipitat se adaugă 4 ml alcool 95 %, se desprinde pp.cu o baghetă care se va spăla cu alcool.
- se centrifughează 10 min. la 3000 t/min.
- se decantează supernatantul

B. Hidroliza

- peste pp. se adaugă 1 ml HCl 3 N. Se desprinde pp. cu o baghetă care se va spăla cu 1 ml HCl 3 N.

- Fierbere 30 minute (normal 4 ore).
  In capul eprubetei se pune o pâlnie de glicemie.
- Se răcesc eprubetele la curent de apă rece.
- Se centrifughează 10 min. la 3000 t/min.

C. In alte eprubete gradate se decantează supernatantul.
-se adaugă 1 pic. roşu de metil
-se neutralizează cu N_aOH 3 N
(viraj de la roşu la slab roz-galben)
-se completează la 10 ml cu apă bidistilată

D. Urmează apoi reacţia de culoare

In eprubete obişnuite (mari) se măsoară:

	Probă (ml)	Etalon (ml)	Martor (ml)
- supernatant (filtrat)	0,5	-	-
- Etalon glucozamină	-	0,5	-
- Apă bidistilată	-	-	0,5
- Acetil-acetonă	0,5	0,5	0,5

Fierbere 10 minute (normal 20 minute) după care se răcesc la curent de apă rece şi se adaugă în continuare:

- Alcool etilic 95 %	2,5	2,5	2,5
- Reactiv cromogen	0,5	0,5	0,5

Repaus 20 de minute (normal 45 minute) la temperatura camerei (sau fierbere 3 minute).
Se citesc extincţiile la 530 nm.

Calcul

$$\frac{E_P}{E_E} \times 500 = \text{mg/100 ml ser}$$

Valori normale

Ser: 80 - 124 mg/100 ml ser
Urină: - bărbaţi: 8 mg % ml urină
- femei: 66,8 mg % ml urină (este crescută la menopauză, infecţii, inflamaţii).

Interpretare

Creşterea cantităţii de hexozamine se explică cel mai adesea prin modificări histochimice importante provocate de diverse agresiuni patologice; dar ea este uneori puţin marcantă.

In infecţii acute (reumatismul articular, pneumonie) apare

o uşoara creştere, atingând 140 mg % ml ser. In artroze reumastimale,creşterea este moderată şi nu depăşeşte 190 mg.

O manifestare mai importantă se observa în stările patologice ce se însoţesc de fenomene de proliferare celulară excesivă, urmată de necroză. Se constată o creştere puternică a cantităţii de hexozamine în carcinoame şi mai ales în maladia Hodgkin, de 160 - 260 mg %.

In tuberculoză atinge valoarea de 211 mg %; endocardită-144 mg %, boala hepatică parenchimatoasă - 158 mg %.

Scanned with OKEN Scanner

LIPIDE

DOZAREA LIPIDELOR TOTALE IN SER
(metoda cu Sulfo-fosfovanilină)

Principiu

Lipidele serice (acizi graşi, fosfolipidele, colesterolul) reacţionează, după ce au fost hidrolizate cu acid sulfuric, cu reactivul fosfovanilinic dând o coloraţie roz.

Reactivi

1. Reactiv cromogen:
   - vanilină 200 mg
   - apă bidistilată 27,6 ml
   - acid artofosforic (d=175) 72,4 ml

Se dizolvă vanilina în 10 ml apă distilată, într-un balon cotat de 100 ml.

Se adaugă 72,4 ml H_3PO_4 (d=1,75, conc.=89 %);

Se completează la semn cu apă bidistilată.

2. Etalon colesterol:
   375 mg colesterol se dizolvă în 100 ml acid acetic (corespunde la o conc.de 560 mg lipide/100)
3. Acid sulfuric concentrat d=1,84

Modul de lucru

Reacţia de hidroliză se face în eprubete de hemoliză:

	Probă (ml)	Etalon (ml)	Martor (ml)
Ser	0,05	-	-
Sol. etalon	-	0,05	-
Acid sulfuric conc.	1	1	1

Se fierbe 15 minute pe baia de apă, se răcesc şi în alte eprubete se execută reacţia de culoare:

	Probă (ml)	Etalon (ml)	Martor (ml)
Hidrolizat proba	0,1	-	-
Hidrolizat etalon	-	0,1	-
Hidrolizat martor	-	-	0,1
Reactiv cromogen	2	2	2

Repaus 30 minute. Se citesc extincţiile la 530 nm faţă de martor.

Calcul

$$\frac{E_p}{E_{et.}} \times 500 = \text{mg lipide /100 ml ser}$$

Valori normale

400 - 800 mg/100 ml ser

DOZAREA COLESTEROLULUI TOTAL IN SER
(Metoda Grigaut)

Principiu

Colesterolul solvit în cloroform, în prezenţa anhidridei acetice şi a acidului sulfuric concentrat formează un compus de culoare verde.

Reactivi

1. Alcool sodat:
   - alcool 60 % — 100 ml
   - NaOH — 0,5 g
2. Eter
3. Cloroform
4. Anhidridă acetică
5. Acid sulfuric conc.
6. Sol. etalon colesterol 0,06 g % în cloroform.

Modul de lucru

Intr-o pâlnie Grigaut se introduc 6,5 ml alcool sodat şi 1 ml ser, se adaugă 7,5 ml eter. Se amestecă cu atenţie pentru a nu se emulsiona şi presiunea vaporilor de eter să nu arunce dopul. Se lasă în repaus 5 minute, timp în care se separă două straturi: un strat inferior - apos şi un strat superior - alcool-eter în care se află extras colesterolul. Se scoate dopul şi se deschide cu precauţie robinetul, lăsând să se scurgă stratul inferior până la limita de separare a celor două straturi.

Pentru a îndepărta alcoolul din eter, se spală cu 10 ml apă distilată care se vor prelinge pe pereţii pâlniei. Se amestecă uşor, se lasă în repaus 5 minute şi se îndepărtează stratul inferior apos. Se repetă operaţia încă odată.

Stratul de eter este adus într-o capsulă perfect curată şi uscată, pe la partea superioară a pâlniei de separare. Se spală pâlnia de două ori cu câte 3 ml eter care se trec de asemenea în capsulă în acelaşi mod.

Se evaporă conţinutul capsulei pe baia de apă. Reziduul se reia cu 1 ml cloroform şi se trece într-o eprubetă gradată. Se repetă operaţia până la volumul de 2,5 ml. In altă eprubetă gradată se introduce 2,5 ml soluţie etalon de colesterol. Se adaugă în ambele eprubete câte 1 ml de anhidridă acetică şi 3 picături de acid sulfuric conc. Se astupă eprubetele cu un dop şi se lasă la întuneric 30 de minute. Se citesc extincţiile probei şi etalonului faţă de apă distilată la 560-580 nm.

Calcul

$$\frac{E_p}{E_{et.}} \times 1,5 = \text{g colesterol la 1000 ml ser}$$

Valori de referinţă

1,6 - 1,8 g ‰ ml ser

Observaţii

Dintre metodele folosite pentru dozarea colesterolului, metoda Grigaut este cea mai fidelă, datorită faptului că prin folosirea alcoolului sodat canapsele lipoproteice sunt desfăcute, în eter trecând numai colesterolul.

Reacţia de culoare nu este interferată de compuşi care reacţionează cu acidul sulfuric (triptofan, acizi biliari etc.).

Pipetele şi sticlăria trebuie să fie uscate pentru că prezenţa urmelor de apă scade intensitatea culorii şi provoacă emulsie

DOZAREA COLESTEROLULUI IN SER

(Metoda Rappoport)

Principiu:

Reacţia Liebermann-Burchard

Reactivi

1. Reactiv anhidridă/acid acetic
   - anhidridă acetică 30,5 ml
   - Acid acetic glacial 19,5 ml
2. Acid sulfuric conc. (D=1,84)
3. Sol. etalon colesterol 0,2 g % ml acid acetic glacial.

Modul de lucru

In următoarele eprubete de reacţie se pipetează:

	Probă (ml)	Etalon (ml)	Martor (ml)
Reactiv anhidridă/acid acetic	2,5	2,4	2,4
Ser	0,1	-	-
Sol. etalon	-	0,1	-
Apă bidistilată	-	0,1	0,1

Se agită şi se lasă la temperatura laboratorului, după care se adaugă:

Acid sulfuric conc.	0,5	0,5	0,5

Se agită energic, se lasă într-o baie de apă la temperatura de aproximativ 25°C timp de 10 minute, după care se citesc extincţiile probei şi etalonului faţă de martor la 625 nm (550-650).

Calcul

$$\frac{E_p}{E_{et.}} \times 2 = \text{g colesterol la 1000 ml ser.}$$

Observaţii

In general, precipitatul care apare datorită prezenţei proteinelor din ser,dispare după agitare.

Prin adăugarea a 0,55 g acid sulfosalicilic sau a 0,25 g acid dimetil-benz-sulfonic la reactivul anhidridă/acid acetic glacial, se împiedică apariţia precipitatului proteic iar complexul devine mai stabil.

Este recomandabil ca atunci când suntem nevoiţi a citi un număr mare de probe, să repetăm citirea etalonului după citirea unui număr de 4-5 probe, iar în cazul când avem modificări de extincţie, să luăm în considerare noua extincţie pentru următoarele 4-5 probe.

Serurile hemolizate nu pot fi folosite.

Serurile icterice furnizează valori mari, datorită prezenţei bilirubinei, care dă o reacţie de 5 ori mai intensă decât a colesterolului, adică 1 mg bilirubină = 5 mg colesterol. Este recomandabil ca în aceste cazuri să se folosească metoda Grigaut.

Când se foloseşte acid acetic glacial p.a care are o concentraţie de 99-100 % sau este proaspăt distilat, nu este necesar a se adăuga sulfat de sodiu anhidru.

Acidul acetic şi sulfuric nu trebuie să conţină substanţe oxidante (urme de HNO_3), căci duc la apariţia unei oxidări secundare cu diminuarea densităţii optice.

Acidul acetic trebuie să fie lipsit de acetaldehidă, deoarece aceasta în prezenţa unor constituienţi din ser de natură indolică (triptofanul) şi în mediu de acid sulfuric dă o reacţie de culoare, parazitară de intensitate mare.

Calitatea reactivului se verifică astfel: la 0,2 ml ser nehemolizat se adaugă 2,8 ml acid acetic. Se agită, după care se adaugă 2 ml acid sulfuric conc. Se agită din nou. Culoarea care apare, trebuie să fie sensibil aceeaşi cu cea obţinută prin amestecul a 0,2 ml ser cu 4,8 ml acid sulfuric conc. Un acid acetic impur dă în aceste condiţii o coloraţie violetă sau brună.

Pentru obţinerea unui acid acetic de bună calitate, se adaugă 20 g trioxid de crom sau acid cromic la 1000 ml acid acetic glacial şi se fierbe într-un refrigerent cu reflux timp de 120 minute, sau 24 ore la temperatura laboratorului, după care se distilă. Prima porţiune de aproximativ 50 ml nu se foloseşte la prepararea reactivului.

Apa distilată se adaugă atât la etalon cât şi la martor, pentru a fi în aceeaşi concentraţie ca şi la ser, prezenţa acesteia modificând reacţia de culoare.

Legea lui Beer este respectată până la o concentraţie de 5 g ‰. Este necesară o diluţie a serului cu ser fiziologic, la probele cu valori peste această limită şi deci o nouă determinare. La calcul trebuie să se ţină seama de diluţie.

DOZAREA COLESTEROLULUI DIN FRACTIUNILE LIPOPROTEICE (Beta şi alfa)

Lipidele plasmatice (colesterolul, TG, fosfolipidele), se găsesc sub formă de complexe macromoleculare lipoproteice, care conţin proporţii relativ fixe de lipide şi proteine.

Criteriile de clasificare ale lipoproteinelor plasmatice, se bazează pe diferenţele în mărimea şi încărcarea complexelor lipoproteice, determinând un comportament diferit la ultracentrifugarea de flotaţie şi electroforeză.

Separarea lipoproteinelor prin ultracentrifugare, se bazează pe faptul că, prin acest procedeu, efectuat într-un mediu cu o

anumită densitate, unele fracţiuni lipoproteice, bogate în TG şi esteri de colesterol, dar mai sărace în proteine şi având o densitate mai mică, tind să urce la suprafaţă (să fleteze).

Separarea electroforetică a lipoproteinelor, bazată pe diferenţele de încărcare electrică şi G.M., se realizează în agarează sau în gel de poliacrilamidă. Deşi metoda electroforezei în agaroză este mai accesibilă laboratorului clinic, literatura de specialitate clasifică lipoproteinele mai ales pe baza densităţii lor.

Se pot separa următoarele 5 grupe mari de lipoproteine:

1. Chilomicronii, alcătuiţi mai ales din TG, de origine exogenă, nu migrează electroforetic, datorită slabei încărcări electronegative.

2. VLDL, lipoproteine cu densitate foarte joasă sau prebeta lipoproteine, au un conţinut important de TG, de proveniență endogenă, fiind sintetizate la nivelul ficatului. La electroforeza în gel de poliacrilamidă, care realizează o "cernere moleculară", VLDL migrează înapoia LDL.

3. Din catabolismul VLDL, rezulta lipoproteine cu densitate intermediară sau IDL (între LDL şi VLDL), în cantităţi foarte mici la subiecţii normali.

4. LDL, lipoproteine cu densitate joasă, sau beta-lipoproteine bogate în esteri de colesterol, au fost subdivizate în două fracţiuni: LDL_1 şi LDL_2 (componenta majoră din plasmă).

5. HDL, lipoproteine cu desitate mare, sau alfa-lipoproteine, au fost subimpărţite în HDL_2, HDL_3 şi cantităţi infime de HDL_1, cu un conţinut mai ridicat în esteri de colesterol decât HDL_2.

Sunt implicate în metabolismul VLDL, chilomicronilor şi al colesterolului, transportând în jur de 17 % din colesterolul plasmatic total. Este un factor de antirisc aterogen.

Lipoproteine LDL (beta-lipo), transportă aproximativ 70 % din colesterolul circulant, constituind un factor de risc aterogen.

Principiul de dozare

Beta-lipoproteinele serice (LDL) sunt precipitate selectiv cu $MgCl_2$ şi fosfowolframat de sodiu (fosfotungstat de sodiu), prin metoda BURNSTEIN. Prin centrifugare se separă supernatantul, care conţine numai alfa-lipoproteine (HDL). In supernatant se dozează apoi CT (colesterolul total) prin metoda LIEBERMAN-BURCHARD. In prezenţa anhidridei acetice şi a acidului sulfuric se formează un compus intens colorat în verde, fotocolorimetrabil la 625 nm.

Reactivi

1. Fosfotungstat de sodiu 4 g %:
   40 g acid fosfotungstic se dizolvă în 800 ml apă distilată, adăugând mici cantităţi de NaOH 1 N până la pH=7,4. Se completează cu apă la 1000 ml.
2. $MgCl_2.6H_2O$, 2 M (406,6 g %o):
   Se dizolvă 10,15 g la 25 ml apă bidistilată.
3. Reactivul colesterolului sau reactivul cromogen:
   CH_3COOH 7 M : 195 ml
   Anhidridă acetică 6,5 M : 305 ml
   Se amestecă sub curent de apă.
4. H_2SO_4 conc. d=1,84
5. Etalon colesterol 200 mg %, în acid acetic glacial.
   Se dizolvă la slabă încălzire.

Modul de lucru

1. Precipitarea beta-lipoproteinelor:
   Intr-o eprubetă de centrifugă se pipetează:
   - 0,5 ml ser
   - 0,05 ml fosfotungstat de sodiu
   - 0,025 ml $MgCl_2.6H_2O$

Se agită energic şi se lasă 10 minute la temperatura camerei pentru a precipita beta-lipoproteinele. Apoi se centrifughează 10 min. la 4000 t/min. Se separă supernatantul în care se dozează colesterolul -alfa-lipoproteic.

2. Dozarea HDL-colesterolului

Reactivi	CT	HDL-col.	S	M
Ser, supernatant (ml)	0,1	0,1	-	-
Reactiv cromogen (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0
Sol. etalon colesterol (ml)	-	-	0,1	-

Se agită, se lasă 15 minute în baia de apă la 25°C, apoi se pipetează pe pereţii eprubetelor:

H_2SO_4 conc. (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5

Se agită energic până la solvirea (dispariţia)precipitatului format, apoi se lasă 15 min. în aceeaşi baie de apă la 25°C. Va apare o culoare verde intens.

Se citeşte apo extincţia celor trei probe, faţă de martor, la 625 mm în cuva de 1 cm.

Calcul

Pentru CT: mg CT % ml ser = $\frac{E_p}{E_E}$ x 200

Pentru HDL-col.: mg HDL-col. % ml ser = $\frac{E_p}{E_E}$ x 200 x 1,15

1,15-factor care provine din diluţia serului în urma precipitării LDL.

Deoarece în VLDL, concentraţia colesterolului este de aproximativ 1/5 din cea a TG (exprimată în mg), se poate calcula concentraţia colesterolului din fracţiunea LDL (în mg %), după formula FRIEDEWALD :

$$\text{LDL-col (mg \%)} = \text{CT} - (\text{HDL-col.} + \frac{\text{TG}}{5})$$

O creştere marcată a TG coincide cu o creştere a VLDL şi/sau a chilomicronilor, în timp ce o creştere solitară a CT atrage atenţia asupra LDL.

Valori de referinţă

CT = 140-260 mg % (120-220 mg % până la 40 ani)

HDL-col. mg % = 40 - 65 mg %, cu variaţii între:

- femei: 50 -65 mg %, creşte cu vârsta
- bărbaţi: 40 - 55 mg %

LDL-col. = 120 - 220 mg % ml ser

Interpretare

Există aşa numitele rapoarte ale colesterolului sau ale "indicilor de aterogenitate", cu următoarele valori:

1. Colesterol total seric/HDL-col.= 3-3,5 (risc aterogen 5)
2. LDL-col./HDL-col. = 2,5-3,0 (risc aterogen 4)
3. HDL-col. /CT = 0,13-0,33 (risc aterogen 0,12)

Raportul colesterolului poate fi corectat cu vârsta, după ecuaţia:

Vârsta (ani) x (CT/HDL-col.) = 230

Valorile peste 230, diferenţiază bolnavii cu cardiopatie ischemică de cei aparent sănătoşi.

Factori care cresc nivelul HDL-col.:

- Sexul (la femei), datorită estrogenilor.
- Greutatea corporală normală, comparativ cu obezitatea,

- Intoxicaţia cu pesticide,
- Administrare de acid nicotinic, heparină,
- Consum moderat de alcool (mai puţin de 50 g/zi),
- Activităţi fizice intense.

Factori care scad nivelul HDL-col.:

- Sexul (la bărbaţi), datorită androgenilor,
- Obezitatea, diabetul zaharat netratat-insulino-dependent,
- Hiper-TG, hiperlipoproteinemii,
- Ateroscleroza la vârstnici,
- Uremia, hepatopatii, obstrucţii biliare,
- Boli genetice: boala TANGIER.

Prevalenţa bolilor coronariene (CHD) este direct proporţională cu creşterea nivelului CT, LDL-col. şi TG serice şi invers proporţională cu nivelul HDL-col., care constituie un factor de antirisc ateregen.

In urma studiului cu beta-blocante, s-a constatat că propranololul, metoprololul, pot altera compoziţia diferitelor fracţiuni lipoproteice.

S-a constatat că suplimentarea dietei cu ouă, creşte nivelul colesterolului din alfa-lipoproteine cu 18 % şi cel din beta-lipo. cu 40 %. Mărirea rezervelor de colesterol hepatic, care are loc în timpul dietei suplimentare cu ouă pare a avea un mai mare efect asupra sintezei LBL decât asupra catabolismului său. Rata sintezei creşte cu 23 % şi se menţine pe întreaga perioadă de suplimentare în dietă.

DOZAREA LECITINEI IN SER

Principiu

Fosfatidele din ser, împreună cu proteinele, sunt precipitate şi separate de fosforul anorganic care rămâne în soluţie. Precipitatul este pus la mineralizat pentru distrugerea părţii organice. Fosfatul eliberat de partea organică reacţionează cu molibdatul de amoniu cu formare de fosfomolibdat. Acesta se reduce la albastru de molibden.

Reactivi

1. Acid tricloracetic 5 g %
2. Acid percloric 70 %
3. Acid azotic conc.

4. Molibdat de amoniu 5 g % în apă distilată
5. Acid ascorbic 50 mg în 25 ml HCl N/10
6. Sol. etalon fosfat (sol. stoc) KH_2PO_4 (4,393 g ‰)
7. Sol. etalon de lucru:
   0,4 ml sol. stoc la 100 ml apă distilată.
   (0,004 mg/ml)

Modul de lucru

Intr-o eprubetă de centrifugă se va pipeta pentru probă:

	Probă (ml)	Etalon (ml)	Martor (ml)
Acid tricloracetic	2,5	-	-
Ser	0,1	-	-

După un repaus de 5 min. se centrifughează proba. Supernatantul se decantează şi peste precipitat se adaugă:

Acid percloric	0,25	-	-
Acid azotic	2 pic.		

Se agită pentru a se desprinde precipitatul şi se pune proba la 180°C unde se menţine 15 - 20 minute pentru distrugerea părţii organice. Lichidul la început galben-brun se va decolora prin mineralizare şi devine incolor, clar. Se trece mai departe la dozare reluând cantitativ proba în eprubete de reacţie:

Apă distilată	2,5	-	2,5
Sol. etalon de lucru	-	2,5	-
Acid percloric	-	0,2	0,2
Molibdat de amoniu	0,2	0,2	0,2
Acid ascorbic	0,1	0,1	0,1

Se agită, se lasă în repaus timp de 10 minute după care se citeşte extincţia probei şi a etalonului faţă de martor, la 750 nm.

Calcul

$$\text{Conc. lecitinei} = \frac{E_P}{E_E} \times 2,5 = \text{g/1000 ml ser}$$

Interpretare

Modificări ale metabolismului lipidic întâlnim în afecţiuni ca: ateroscleroza, hiperlipemie esenţială, obezitate, diabet.

Sindromul umoral al aterosclerozei se manifestă în special prin perturbări ale metabolismului lipidic şi anume: dereglarea metabolică a colesterolului, inversiunea raportului colesterol/fosfolipide şi concentraţia anormală de macromoleculo complexe lipopro-

teice.

Media colesterolemiei prezintă o cifră semnificativ mai ridicată faţă de cea a cifrelor de la sănătoşi; cifrele individuale sunt însă destul de ridicate. Lipemia se găseşte asociată cu colesterolemia. Procentul cel mai ridicat al lipidelor totale se întâlneşte în stadiul umoral preclinic, se menţine procentual şi faţă de stadiul clinic al bolii, fiind urmată de hipercolesterolemie.

Caracteristic este însă creşterea fracţiunii beta-lipoproteinelor, fracţiune bogată în colesterol, faţă de fracţiunea alfa-lipoproteică de care se leagă mai ales grăsimile neutre şi mai puţin colesterolul şi care prezintă tendinţă la scădere. Această anomalie de distribuţie poate apărea fără să existe o modificare cantitativă a colesterolului. Creşterea trigliceridelor la tineri poate fi un indiciu de ateroscleroză mai semnificativ decât hipercolesterolemia.

Hiperlipemia esenţială este un sindrom caracterizat prin creşterea grăsimilor neutre din ser sub formă de chilomicroni mai bogaţi în colesterol şi fosfolipide decât cei normali. Aspectul lăptos clasic al serului este dat tocmai de prezenţa chilomicronilor. Colesterolul prezintă valori ridicate, în special fracţiunea liberă. Modificările colesterolului nu se produc paralel cu a grăsimilor neutre.

Fosfolipidele prezintă valori ridicate, raportul colesterol/fosfolipide fiind crescut peste unitate. Testul Kunkel cu fenol est pozitiv.

In obezitate se constată creşterea constantelor biochimice legate de tulburări ale metabolismului lipidic. Există un paralelism între creşterea colesterolului seric şi a raportului beta/alfa-lipoproteine.

Diabetul are drept cauză primară dereglarea metabolismului glucidic şi indirect a celui lipidic. Hiperlipemia este rezultatul mobilizării excesive a grăsimilor de depozit care încearcă fără să izbutească să suplinească lipsa de glucide iar hipercolesterolemia este rezultatul creşterii sintezei endogene a colesterolului.

Creşterea cetogenezei hepatice şi scăderea utilizării acestora de către ţesuturile extrahepatice duce la apariţia de corpi cetonici în urină, care se elimină sub formă de săruri; consumul de alcali este crescut ducând astfel la acidoză.

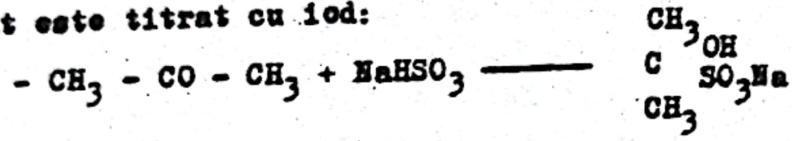
Scanned with OKEN Scanner

Tulburări ale metabolismului lipidic se întâlnesc în boala canceroasă, hepatita virotică şi icterul prin obstrucţie.

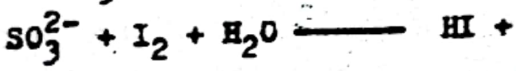
DETERMINAREA CORPILOR CETONICI

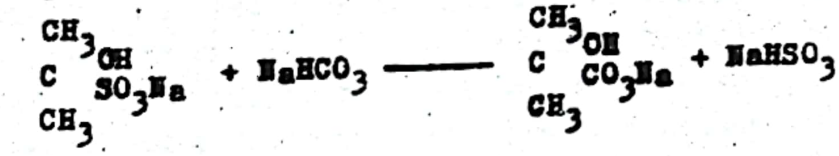
Principiu

Corpii cetonici, datorită grupării carbonil, reacţionează cu bisulfitul de sodiu. Excesul de bisulfit este îndepărtat prin tratare cu iod. Complexul format (corpi cetonici-bisulfit) este descompus prin tratare cu bicarbonat de sodiu, iar bisulfitul eliberat este titrat cu iod:



- $NaHSO_3$ în exces se tratează cu iod:





Reactivi

1. Acid acetic diluat
2. Sol. bisulfit de sodiu 1 %
3. Sol. amidon indicator
4. Sol. iod N/10
5. Sol. iod N/100
6. Sol. saturată bicarbonat de sodiu

Modul de lucru

Intr-un balon Erlenmeyer de 150-200 ml se introduce 1 ml urină proaspătă şi 20 ml apă distilată. Se aduce pH-ul la valori cuprinse între 2 şi 4 prin acidifiere cu acid acetic (sau cu acid clorhidric) diluat. Se adaugă 5 ml sol. bisulfit de sodiu şi se aşteaptă 15 minute pentru fixarea grupelor carbonil. Se adaugă 3-4 picături de amidon şi se îndepărtează excesul de bisulfit de sodiu prin adăugare de iod N/10 la început până apare culoarea albastră care persistă, apoi adăugare de iod N/100 până la colorație albastră persistentă.

Se adaudă 5 ml soluţie saturată de bicarbonat de sodiu care descompune complexul corpi cetonici-bisulfit. Bisulfitul

eliberat se titrează cu soluţie de iod N/100 până la coloraţie albastră care persistă 10-15 secunde.

Calcul

1 ml iod N/100 corespunde la 0,44 mg acid piruvic.

Numărul de ml (n) din soluţia de iod N/100 utilizaţi la ultima titrare se înmulţeşte cu 0,44 şi se obţine cantitatea de corpi cetonici exprimată în mg de acid piruvic dintr-un ml de urină.

Valori de referinţă

1 - 10 mg corpi cetonici/24 ore sau,

316 mg %o ml urină, cu oscilaţii între 125-381 mg acid piruvic %o.

Interpretare

Testul eliminării corpilor cetonici este utilizat în afecţiunile hepatice, cireze, ficat cardiac.

Cetogeneza hepatică creşte şi scade utilizarea lor ceea ce ar duce la eliminarea în urină.

Eliminare crescută:

- diabet zaharat,
- în efort muscular,
- inaniţie (sau în regim bogat în lipide şi proteine)
- tulburări gastrointestinale acute sau cronice (dispepsie acută la copii, toxicoză),
- vărsături accentuate de sarcină.

P R O T E I N E

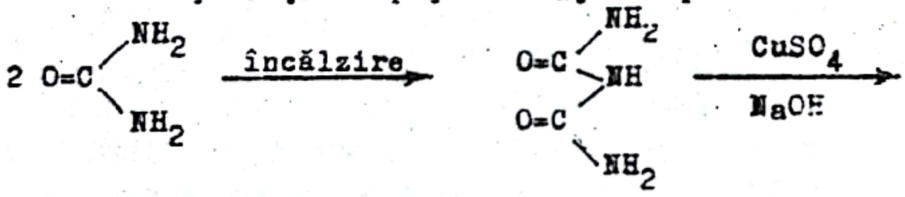
DOZAREA PROTEINELOR PRIN REACTIA BIURETULUI

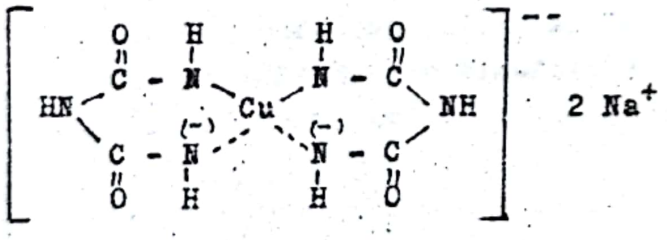
Proteinele plasmatice reprezintă un constituient principal al plasmei sanguine, alcătuind aproximativ 75 % din rezidiul uscat al plasmei (7 g proteine din 9 g rezidiuu uscat).

Principiu

Proteinele, polipeptidele, ca şi biuretul, reacţionează cu ionul de Cu^{2+}, în soluţie alcalină, dand un complex proteic sau peptidic cupro-alcalin, de culoare violet.

Această reacţie, care este dată de compuşi cu legături peptidice R-C(=O)-NH-C(=O)-NH-R, poartă numele de reacţia biuretului, deoarece cel mai simplu compus care dă această reacţie este biuretul obţinut prin încălzirea ureei. Se poate spune că reacţia este dată de compuşi care conţin cel puţin două legături peptidice. Aminoacizii, ureea, acidul uric şi alţi compuşi azotaţi simpli nu interferă.





Reactivi

1. Reactiv biuret:
   - $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ 0,235 g
   - Tartrat dublu de Na şi K 0,94 g
   - NaOH 4,60 g
   - Apă distilată până la 100 ml
2. Sol. Fehling II:
   - Tartrat dublu de Na şi K 0,94 g
   - Na OH 4,60 g
   - Apă distilată până la 100 ml
3. Sol. NaCl 9 g ‰
4. Sol. etalon albumină bovină 9 g %

Modul de lucru

In trei eprubete se pipetează:

	Probă (ml)	Etalon (ml)	Martor (ml)
Clorură de sodiu	0,9	0,9	1
Ser	0,1	-	-
Etalon albumină bovină	-	0,1	-
Sol. Fehling II	-	-	4
Reactiv biuret	4	4	-

Se agită eprubetele şi se lasă în repaus la întuneric 20 de minute şi apoi se fotometrează proba şi etalonul faţă de martor la 546 nm.

Calcul

$\frac{E_P}{E_E}$ x 0,008 x 10.000 = g proteine ‰, în care:

0,008 = g proteine la 0,1 ml ser

10.000 = factor necesar raportării la 1000 ml se

Valori de referinţă

66 - 87 g proteine la 1000 ml ser.

La copii, zona normală este mai largă:

Nou născuţi: 52 - 90 g ‰ ml ser

Până la 1 an: 55 - 87 g ‰ ml ser

1 - 3 ani: 60 - 86 g ‰ ml ser

Interpretare

Proteinemia totală, variază în special la copii, în funcţie de modificările hidroelectrolitice plasmatice.

Valoarea proteinemiei este mai mică în clinostatism, mai mare cu 8 % în ortostatism, iar după o perioadă scurtă de efort fizic, creşte în continuare cu 10 %.

Hipoproteinemii

- Afecţiuni hepatice: ciroze hepatice, intoxicaţii cu benzen, tetraclorură de carbon, fosfor;
- Stări de şoc produse de arsuri, hemoragii;
- Afecţiuni renale: glomerulonefroze, glomerulonefrite cronice;
- Stări cașectice produse de inaniţie, gastroenterocolopatii cronice, tumori maligne;
- Colagenoze.

Hiperproteinemii

- Deshidratări acute produse de vomă, diaree, diabet insipid sau zaharat cu apert hidric incorect;
- Mielom multiplu (boala KAHLER)
- Macroglobulinemia WALDENSTRÖM
- Boala OSLER
- Anemie pernicioasă, infecţii acute şi cronice

TESTE DE DISPROTEINEMIE

Disproteinemie, reprezintă termenul prin care se înţelege o modificare calitativă şi cantitativă a proteinelor sanguine, secundar unui mecanism fiziopatologic declanşat de o anumită afecţiune, fiind deci expresia incapacităţii organismului de a menţine constante şi în limite normale, fracţiunile proteinelor sale.

In cursul disproteinemiilor, s-au putut pune în evidenţă proteine străine sângelui normal, numite paraproteine. Prin paraproteine se înţelege momentul apariţiei proteinelor anormale. Cele două noţiuni trebuie subordonate una alteia, întrucât nu există paraproteinemie şi fiecare disproteinemie este însoţită de apariţia paraproteinelor.

Opus stării de disproteinemie este euproteinemia, prin care se înţelege echilibrul dinamic normal al proteinelor sanguine.

Prin testele de disproteinemie, teste de labilitate serică sau reacţii de floculare, se înţelege un ansamblu de reacţii care se tradus prin apariţia unei turbidităţi, sau a unei floculări după adiţia la ser a diferiţilor reactivi, ca urmare a dezechilibrului calitativ şi cantitativ al diferitelor fracţiuni proteice. El poate fi rezultatul diminuării unor factori stabilizanţi (albumine), sau creşterii unor factori precipitanţi (-globuline).

Această labilitate particulară a serului poate fi pusă în evidenţă prin diluţia serului, diminuând astfel forţa ionică a mediului, creşterea tendinţei la precipitare prin adiţia de ioni bivalenţi, adiţia unor substanţe de natură coloidală susceptibilă ea însăşi de a flocula, ca urmare a unei repartiţii anormale unei substanţe organice care realizează legături cu proteinele precipitate.

Pentru reacţiile de floculare se poate utiliza urmărirea serie de reacţii:

Floculareа serului	Reactivi	Testul de labilitate
Săruri ale metalelor grele	$HgCl_2$	Takata - Ara
	$HgCl_2$	Gross - variantă volumetrică
	$CaCl_2$	Weltman - banda de coagulare
	$CdSO_4$	Kunkel
	$CdSO_4$	Wunderly
Substanţe organice	formol	Gaté - gelificare
	fenol	Kunkel
	timol	Mc Lagan
Suspensii coloidale electronegative	cefalină-colesterol	Hanger
Diminuarea conţinutului în săruri	apă distilată	Sia - Iagnov

Testul Mc Lagan

Principiu

La pH = 7,55, timolul floculează globulinele din ser, când acestea sunt crescute peste o anumită concentraţie, formând un complex globulină-timol-colesterol-fosfolipide.

Reactivi

1. Soă. timol tampon pH= 7,6-7,8
   - acid dietil-barbituric (veronal) 1,38 g
   - dietil-barbiturat de sodiu (veronal sodic sau medinal) 1,03 g
   - timol 3,00 g
   - apă distilată până la 500 ml

Totul se pune la fiert până la solvirea completă a timolului. In caz de evaporare, se completează din nou până la 500 ml. Se răceşte apoi la curent de apă, până la tulburealã. Se pulverizează cativa cristali de timol şi se aduc în balon. Se agită, se lasă la rece pentru 12 ore. Se poate utiliza după aceasta, dar se filtrează înaintea fiecărei utilizări.

Această soluţie se mai poate prepara astfel:

a. - timol 10 % în alcool 96 %. Se conservă la $4^{o}C$.

b. - tampon pH=7,8: se diszolvă 2,76 g acid dietil barbituric şi 2,06 g dietilbarbiturat

de sodiu în 800 ml apă, pe baie (60 - 80°C); după solvire se completează la 1000 ml cu apă distilată. Se conservă la 4°C. Se utilizează numai dacă soluţia este limpede.

- soluţie de lucru: într-un balon cotat de 100 ml se introduc 90 ml soluţie b, se încălzeşte pe baia de apă la 60 - 80°C aproximativ 10 minute. Se adaugă 1 ml soluţie a, şi se agită energic până la limpezire; se răceşte la curent de apă şi se completează la 100 ml cu soluţie b. Se utilizează numai dacă este perfect limpede.

2. Sol. clorură de bariu 1,15 g %
3. Sol. acid sulfuric N/5
4. Scara etalon:

Pentru aceasta se amestecă 3 ml din soluţia de clorură de bariu cu 97 ml din soluţia de acid sulfuric. Opacifierea acestei soluţii corespunde la 20 unităţi Mc Lagan.

Se fac apoi diluţiile conform tabelului:

Nr.eprubete	1	2	3	4	5	6 10
U. Mc Lagan	20	18	16	14	12	10 2
Sol.$BaSO_4$	10	9	8	7	6	5 1
Sol. H_2SO_4 N/5	-	1	2	3	4	5 9

Eprubetele se astupă cu dop şi se parafinează. Înainte de utilizare se agită.

Modul de lucru

Se iau într-o eprubetă 3 ml timol şi se adaugă 0,05 ml ser. Se amestecă, se lasă în repaus 30 minute. Se agită din nou şi se compară cu care eprubetă din scară este identitate de turbiditate, se citesc unităţile Mc Lagan corespunzătoare.

Calcul

Turbiditatea testului este dată în unităţi Mc Lagan.

Valori de referinţă

Turbiditatea testului = 0 - 4 U Mc Lagan

Observaţii

Se poate examina extincţia faţă de soluţia de timol la 470 nm, utilizând cuvele de 5 mm. Se citeşte absorbţia însemnată cu cifre negre pe tambur şi se scade din 100. Normal 10 - 20 diviziuni.

Testul poate fi negativ datorită albuminei sau dacă se face din plasmă oxalatată.

Bilirubina, lipemia crescută, unele antibiotice, pozitivează reacţia.

Interpretare

Testul este pozitiv peste 6 U în afecţiunile hepatice difuze, hepatite, sau în ciroză. Serveşte ca test diferenţial între icterul hepatic (reacţie pozitivă) şi icterul prin obstrucţie (reacţie negativă).

DOZAREA UREEI PRIN METODA CU DIACETIL MONOXIMA

Principiu

Ureea în mediu acid de diacetil monoximă şi în prezenţa unui catalizator, formează la cald un complex de culoare roz care poate fi colorimetrat

Reactivi

1. Sol. acid tricloracetic 10 %
2. Sol. diacetilmonoximă 50 mM:
   - Se dizolvă 5,05 g diacetilmonoximă în 1000 ml acid acetic 5 %.
3. Sol. catalizatoare: $FeCl_3$ 1,8 mM; tiosemicarbazidă 0,66 mM; H_2SO_4 2 M; H_3PO_4 2 M.
   - $FeCl_3.6H_2O$ 0,486 g
   - Tiosemicarbazidă 0,060 g
   - H_2SO_4 (d=1,84) 108 ml
   - H_3PO_4 (d=1,71) 114 ml
   - Apă distilată până la 1000 ml

Se prepară amestecul de acizi şi o parte din cantitatea de apă necesară (278 ml). După răcirea amestecului se dizolvă clorura ferică şi tiosemicarbazida. Se completează cu apă la 1000 ml.

4. Sol. etalon uree 5 g %o
5. Sol. etalon uree pentru lucru 0,5 g %o
   (1 ml sol. etalon uree 5 g %o + 9 ml apă distilată)

Modul de lucru

Deproteinizarea

In următoarele eprubete se pipetează:

	Probă (ml)	Etalon (ml)	Martor (ml)
Apă distilată	1	1	1,1
Ser, plasmă, sânge total	0,1	-	-

	Probă (ml)	Etalon (ml)	Martor (ml)
Sol.etalon uree	-	0,1	-
pentru lucru			
Sol. acid tricloracetic 10%	1	1	1

Se agită şi se lasă în repaus 5 minute apoi se centrifughează la 2500 t/min. timp de 5 minute.

Reacţia de culoare:

In următoarele eprubete se pipetează:

	Probă (ml)	Etalon (ml)	Martor (ml)
Supernatant probă	0,1	-	-
Amestec etalon	-	0,1	-
Amestec martor	-	-	0,1
Sol. catalizatoare	1	1	1
Sol. diacetil monoximă	1	1	1

Se agită eprubetele, se fierb 10 minute pe baia de apă la 100°C, se răcesc, selasă în repaus 15 minute. Se citeşte densitatea optică faţă de martor la 540 nm (480 - 580) în cuva de 1 cm diametru.

Calcul

$$\frac{E_P}{E_E} \times 0,5 = g \text{ uree \%o ml ser}$$

Valori de referinţă

Ser: 0,20 - 0,40 g %o

Sânge total: 0,18 - 0,36 g %o

Interpretare

Concentraţia ureei este influenţată de o serie de factori fiziologici printre care şi vârsta; sugarii prezintă o concentraţie de 0,15 g %o, iar copii 0,25 g %o ml ser.

Alimentaţia bogată în proteine poate ridica valoarea ureei peste limita superioară.

Patologic, creşterea ureei în sânge peste limita superioară normală (azotemie) poate fi de origine renală sau extrarenală.

Azotemia renală se întâlneşte în glomerulonefrită cronică şi acută, nefroangioscleroza renală, tumori renale, rinichi polichistic, hidronefroze, hipertrofie de prostată, calculoză şi alte obstacole mecanice.

Azotemia extrarenală corespunde unui hipercatabolism proteic având însă obligatoriu o componentă renală de origine ischemică.

Dozarea ureei în urină nu are semnificaţie clinică la subiecţii normali, deoarece prezintă variaţii mari în funcţie de regimul alimentar.

La bolnavii cu insuficienţe renale acute sau cronice ea este utilă permiţând aprecierea gradului de lezare a parenchimului renal.

DOZAREA ACIDULUI URIC DIN SER

(Metoda Grigaut - Laudat)

Principiu

Acidul uric reduce fosfo-wolframatul, care în mediu alcalin dă o culoare albastră.

Reactivi

1. Sol. acid tricloracetic 20 %
2. Sol. fosfo-wolframică:

Se aduce într-un balon cotat de 1000 ml, 100 g wolframat de sodiu, 80 ml acid fosforic (d=60°B) şi 700 ml apă distilată. Se fierbe cu refrigerent ascendent, timp de 2 ore şi după răcire se completează cu apă distilată la 1000 ml.

3. Sol. etalon acid uric:

- sol. A.	fosfat acid de sodiu	0,25 g
	fosfat disodic	2,25 g
	apă dist.fierbinte până la	250 ml
- sol.B.	acid uric	0,025 g
	apă dist.	5 ml
- sol. C.	acid tricloracetic 20 %	

Se adaugă soluţia A fierbinte peste soluţia B, se adaugă 245 ml apă distilată. Se răceşte şi se completează la 1000 ml cu soluţie C.

4. Carbonat de sodiu 40 g %.

Modul de lucru

Intr-o eprubetă de centrifugă se măsoară 2 ml ser. Se adaugă 2 ml acid tricloracetic 20 %, se amestecă bine cu o baghetă, se lasă în repaus 5 minute şi se centrifughează.

In următoarele eprubete de reacţie se pipetează:

	Probă (ml)	Etalon (ml)	Martor (ml)
Supernatant	2	-	-
Etalon acid uric	-	2	-

	Probă (ml)	Etalon (ml)	Martor (ml)
Carbonat de sodiu	2	2	2
Apă distilată	5,7	5,7	7,7
Fosfo-wolframat	0,3	0,3	0,3

Se agită şi se lasă în repaus 5 minute şi apoi se fotometrează imediat.

Se citeşte extincţia probei şi a etalonului faţă de martor la 630 nm.

Calcul

$\frac{E_P}{E_E}$ x 0,05 = g acid uric la 1000 ml ser

Valori de referinţă

0,04 - 0,05 g acid uric la 1000 ml ser

Observaţii

Trebuie să se evite precipitarea martorului, care ar duce la falsificarea rezultatelor.

In locul reactivului Folin-Wu poate fi folosit reactivul Folin-Ciocîlteu, 0,3 ml dintr-o soluţie 1:3.

DOZAREA ACIDULUI URIC IN URINA
(Metoda Ronchesse)

Principiu

Acidul uric din urină este precipitat sub formă de urat de amoniu, cu soluţie amoniacală de clorură de amoniu. Uratul de amoniu prin tratare cu acid acetic, pune în libertate acidul uric care se titrează iodometric.

Reactivi

1. Sol. Ronchesse:
   - amoniac 150 ml
   - clorură de amoniu 15 g
   - apă distilată până la 1000 ml
2. Amoniac concentrat
3. Clorură de amoniu cristale
4. Sol. iod N/10
5. Sol. borax şi bicarbonat:

Se face separat o soluţie saturată de bicarbonat de sodiu şi o soluţie de borax. Se amestecă în părţi egale.

6. Acid acetic glacial
7. Amidon, indicator

Modul de lucru

Dacă urina prezintă un depozit trebuie făcută omogenă prin agitare şi apoi alcalinizată cu amoniac pentru a se solvi toţi compuşii urici. Din urina astfel omogenizată se iau:

- urină 10 ml
- amoniac 1,5 ml
- clorură de amoniu cristale 1,5 g

Se agită, se lasă în repaus 30 minute şi se filtrează. Precipitatul se spală cu câţiva ml soluţie Ronchesse. Hârtia de filtru cu precipitatul de urat de amoniu, se întinde pe peretele interior al unui pahar conic, cu precipitatul înspre interiorul paharului. Cu un jet de apă puternic se desprinde uratul de amoniu de pe hârtia de filtru. Se pot utiliza pentru această operaţie până la 100 ml apă distilată.

Se trece apoi uratul de amoniu în acid uric. Pentru aceasta se introduce în paharul conic o bucăţică de hârtie de turnesol albastră ce serveşte ca indicator şi apoi acid acetic până la reacţie acidă, până când hârtia de turnesol din albastră devine roşie.

Pentru a titra acidul uric se introduce în pahar soluţie borax şi bicarbonat până la culoarea din nou a hârtiei de turnesol în albastru. Se adaugă apoi două picături din soluţia de amidon şi se titrează cu iod până la culoare albastră. Se notează numărul de ml din soluţia de iod N/10, utilizaţi, cu N.

Calcul

N x 0,84 = g acid uric la 1000 ml urină

Valori de referinţă

0,4 - 0,7 g acid uric la 1000 ml urină

Observaţii

La rezultat se adaugă 0,01 g care reprezintă un factor de corecţie.

Când cantitatea de acid uric astfel titrat este mai mică decât 0,1 g ‰, se precipită acidul uric cu o cantitate dublă de clorură de amoniu şi se lasă în repaus 24 ore.

Nu se titrează direct acidul uric cu iod, aşa cum se găseşte în urină, deoarece în urină se mai găsesc şi alţi compuşi care

pot reacţiona cu iodul .

Interpretare

Acidul uric la om reprezintă termenul final al catabolismului oxidativ al bazelor purinice.

Creşterea concentraţiei sanguine a acidului uric, hiperuricemia, se produce prin două mecanisme:

1. prin catabolism exagerat al nucleoproteinelor endogene, întalnit în leucemii acute şi cronice, pneumonii în faza de rezoluţie, intoxicaţii cu plumb şi mercur, arsuri întinse, toxicoze gravidice;

2. prin defect de eliminare, ca în insuficienţa cardiacă, adenom de prostată, nefrite.

Supraîncărcarea cu acid uric a ţesuturilor la gutoşi, determină constant hiperuricemie, în general între 0,7 - 0,9 g ‰

In urina unui subiect normal cu alimentaţie mixtă se elimină în medie 0,4 - 0,7 g ‰ acid uric în parte sub formă de acid, în parte sub formă de urat alcalin.

Acidul uric excretat are o dublă sursă: exogenă, alimentară datorită compuşilor purinici şi endogenă prin catabolizarea nucleoproteinelor celulare. Chiar dacă subiectul este supus unui regim complet lipsit de purine, urina continuă să conţină o cantitate apreciabilă, care poate varia de la 0,3 la 0,7 g ‰ şi rămâne constantă pentru fiecare subiect.

Există uneori eliminări crescute urinare de acid uric în diverse afecţiuni, caracterizate prin distrugeri celulare importante, ca în leucemii, unde se poate ajunge la 5 g pe zi. In gută brusca descărcare de acid uric în urină corespunde de cele mai multe ori cu creşterea depunerilor în capilare şi cu declanşarea crizei dureroase.

Scleroza renală din guta cronică duce la retenţia acidului uric, la creşterea uricemiei.

DOZAREA BILIRUBINEI
(Metoda Jendrassik)

Bilirubina în ser se găseşte sub formă de:

- bilirubină liberă, insolubilă (legată de proteine) sau indirectă;
- bilirubină conjugată, solubilă (glucuronid) - directă.

Bilirubina conjugată, care este hidrosolubilă reacţionează repede cu acidul sulfanilic diazotat (r.diazo), formând un complex colorat în roşu (în mediu neutru) - un colorant azoic (azopigment).

Aceasta este bilirubina directă.

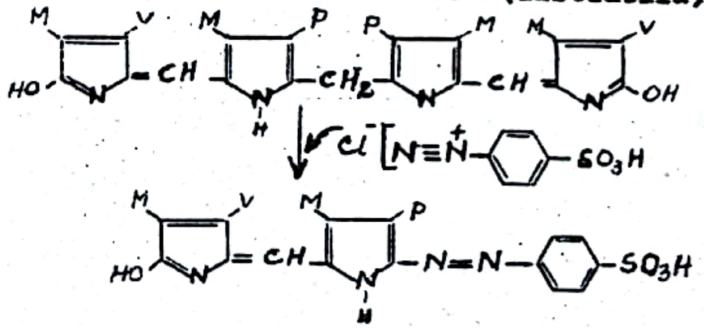
Bilirubina liberă, neconjugată, nu este hidrosolubilă, nu reacţionează direct cu reactivul diazo, dar după tratarea cu un accelerator (cafeină, benzoat de sodiu, salicilat, antipirină) sau cu alcool metilic, poate da reacţia de formare a azopigmentului.

Aceasta este bilirubina indirectă.

Principiul reacţiei

Bilirubina conjugată formează cu acidul sulfanilic diazotat un colorant azoic de culoare roşie în mediu neutru.

Prezenţa cafeinei este necesară pentru a putea reacţiona cu reactivul diazo şi bilirubina liberă (insolubilă).



Reactivi

1. Sol. cafeină:
   - cafeină 20 g
   - benzoat de sodiu 30 g
   - acetat de sodiu 50 g
   - apă distilată 400 ml

Se agită şi se încălzeşte uşor până la solvirea completă.

2. Sol. clorură de sodiu 9 g %o
3. Reactiv diazo:

Sol. A: acid sulfanilic 0,5 g
HCl conc. 1,5 ml
Apă distilată pînă la 100 ml
Sol. B: azotit de sodiu 0,5 g
apă distilată la 100 ml

In momentul întrebuinţării se amestecă 10 ml sol. A cu 0,3 ml soluţie B.

Modul de lucru

In următoarele eprubete se pipetează:

	B_T (ml)	B_D (ml)	Martor (ml)
Cafeină (accelerator)	1,75	-	1,75
Reactiv diazo	0,25	0,25	-
NaCl 9 g %	-	1,75	0,25
Ser	0,5	0,5	0,5

Se agită eprubetele, se lasă 5 minute în repaus. Se citesc extincţiile faţă de martor la 546 nm (530 nm).

Calcul

$$\frac{E^{530}}{0,943} \times \frac{V_{final}}{V_{probă}} = \text{mg bilirubină/100 ml ser.}$$

V_{final} = volumul total din eprubetă

$V_{probă}$ = volumul de ser luat în lucru

0,943 = coeficient de extincţie procentual al azopigmentului la 530 nm (la conc. 1 mg/100)

$$\frac{E^{530}}{0,943} \times \frac{2,5}{0,5} = E^{530} \times 5,3 = \text{mg bilirubină/100 ml ser}$$

$B_T - B_D = B_{liberă}$ (indirectă)

Valori normale

Bilirubina totală: 1,0 - 1,2 mg/100 ml ser
Bilirubina directă (conjugată): 0,1 - 0,4 mg/100 ml ser
Bilirubina indirectă (liberă) : 0,2 - 0,7 mg/100 ml ser

Interpretare

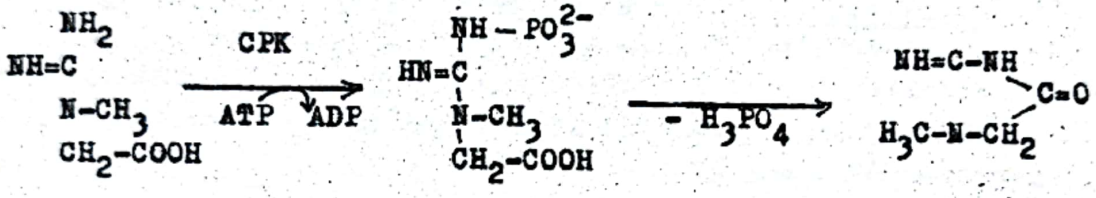
Bilirubina este crescută în toate sindroamele icterice. Bilirubina totală este crescută în ser, în icterele parenchimatoase din hepatitele virotice, toxice, cirozе hepatice cu insuficienţe decompensate. Bilirubina directă creşte în icterele obstructive

datorate calculilor biliari, tumorilor canalelor biliare sau unui chist hidatic.

DOZAREA CREATININEI IN SER SI URINA

Creatinina este un produs final al metabolismului aminoacizilor, deoarece ea provine din creatină, care se sintetizează din glicocol, arginină şi metionină. Creatina se găseşte în muşchi, unde serveşte drept precursor pentru sinteza creatin fosfatului, compus macroergic, cu rol deosebit în fenomenele contracţiei musculare.

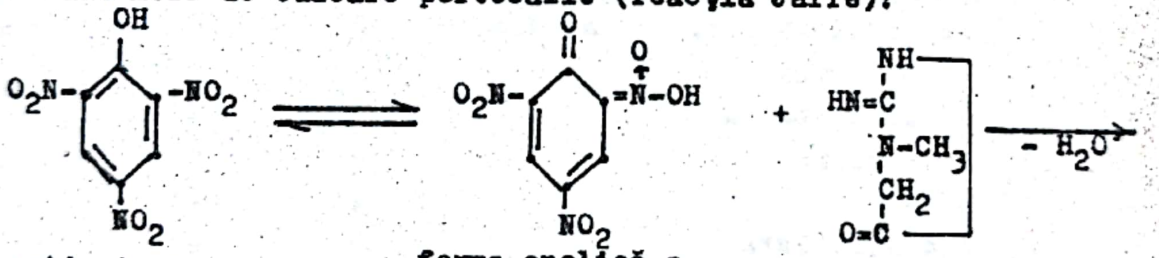
Creatinfosfatul, după ce participă la chimismul contracţiei musculare, pierde acid fosforic şi se transformă în creatinină, care se elimină prin urină.



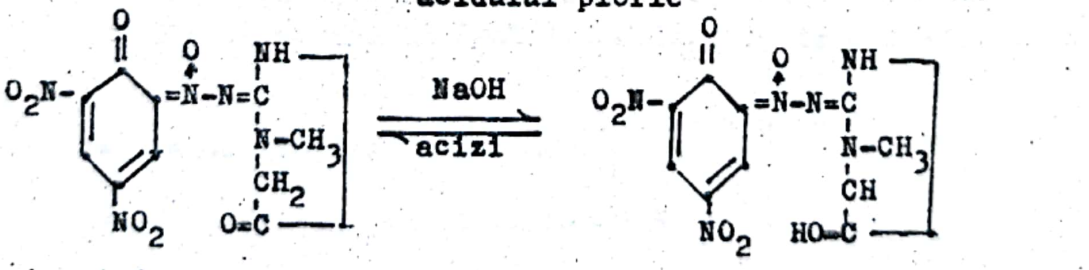
creatina — creatinfosfat — creatinină

Principiu

Creatinina reacţionează cu forma enolică a acidului picric dând picratul de creatinină care în mediu alcalin se transformă în forma tautomeră de culoare portocalie (reacţia Jaffé):



acid picric — forma enolică a acidului picric — creatinină



picrat de creatinină — forma tautomeră a picratului de creatinină

Reactivi

1. Sol. saturată de acid picric:

- se solvă 4 g acid picric în 250 ml apă distilată, încălzind pe baia de apă. După răcire se decantează supernatantul.

2. NaOH 10 g %

3. Sol. etalon de creatinină:

- 0,1 g creatinină se dizolvă în 100 ml HCl 0,1 N. In momentul întrebuinţării se diluiază 1:100 cu apă distilată. Această soluţie conţine 1 mg creatinină/100 ml.

Modul de lucru

Depreteinizarea. In eprubete de centrifugă se pipetează:

	Probă (ml)	Etalon (ml)
Ser (sau urină diluată 1/100	1	-
Acid picric	3	3
Sol. etalon creatinină	-	1

Proba cu ser se centrifughează 5 minute la 3000 t/minut. In alte eprubete se execută reacţia de culoare.

	Probă (ml)	Etalon (ml)	Martor (ml)
Supernatant ser, sau amestec probă urină	2	-	-
Amestec etalon	-	2	-
Acid picric	-	-	1,5
NaOH	0,1	0,1	0,1
Apă distilată	-	-	0,5

Se agită eprubetele şi după 20 minute se citesc extincţiile probei şi etalonului faţă de martor la 530 nm

Calcul

Pentru ser: $\frac{E_P}{E_E}$ = mg creatinină/100 ml ser

Pentru urină (aceasta fiind diluată 1:100):

$\frac{E_P}{E_E}$ = g creatinină/1 urină

Valori de referinţă

Ser: adulţi: 0,5 - 1,2 mg creatinină/100ml

copii : 1,0 - 2,0 mg creatinină/100 ml

Urină: 0,8 - 1,9 mg creatinină/24 ore

Observaţii

Reacţia de culoare nu este specifică, ea putând fi influenţată pozitiv de valori crescute în sânge şi urină a glucozei, fructozei, vitaminei C, corpilor cetonici, androgenilor şi corticosteroizilor.

Interpretare

Creatimina este constituentul azotat cu concentraţie sanguină fixă, neinfluenţată de regimul alimentar, efort fizic sau alte activităţi fiziologice.

Concentraţia sanguină a creatininei totale creşte numai în afecţiunile renale. In afara nefropatiilor propriu zise , variaţii ale concentraţiei sanguine a creatininei se mai întâlnesc şi în afecţiunile în care există o cointeresare renală, cum ar fi eclampsia, guta şi unele afecţiuni hepatice. In aceste cazuri concentraţia creatininei nu este paralelă cu a ureei.

Sursele principale ale creatininei urinare sunt creatina şi fosfocreatina, constituent important al muşchiului striat.

Dozarea creatininei în sange şi urină se utilizează şi pentru stabilirea clearance-ului creatininei care suferă modificări în nefrite.

E L E C T R O L I T I

Diferiţii electroliţi din lichidele biologice, prezenţi sub formă de ioni (cationi sau anioni) sunt esenţiali pentru multe procese vitale.

Dintre aceste elemente minerale o importanţă deosebită o au: calciu, magneziu, sodiu, potasiu, fosforul, clorul. Organismul are nevoie şi de oligoelemente(se găsesc în cantităţi foarte mici) ca: Fe, Cu, Zn, Co etc.

Importanţa electroliţilor pentru organism nu rezultă din greutatea lor ci este în funcţie de numărul de particule pe unitatea de volum (numit mol) de care depinde activitatea lor chimică.

Concentraţia electroliţilor în sânge se exprimă în mg/100 ml ser sau plasmă, sau în mEq/l.

Un miliechivalent pe litru (mEq/l) reprezintă produsul între valenţă şi raportul dintre cantitatea de substanţă exprimată în mg %o şi greutatea atomică.

$$mEq/l = \frac{\text{valenţa x mg \%o}}{\text{greutatea atomică}}$$

Transformarea din mEq/l în mg %o se poate face astfel:

$$mg\ \%o = \frac{mEq/l \times \text{greutatea atomică}}{\text{valenţă}}$$

DOZAREA NaCl IN SANGE

(Metoda Volhard - Charpantier)

Metoda de dozare a clorului este în special cea titrimetrică cu folosirea sărurilor de mercur şi argint.

Principiu

După distrugerea substanţelor organice din ser prin fierbere cu permanganat de potasiu în mediu de acid azotic, clorul din sânge este precipitat cu azotatul de argint. Excesul de $AgNO_3$ se titrează cu sulfocianură de amoniu în prezenţa alaunului feriamoniacal, care indică sfârşitul reacţiei prin apariţia unei coloraţii roz.

$$AgNO_3 + NaCl \longrightarrow AgCl + NaNO_3$$

$$AgNO_3 + CNSNH_4 \longrightarrow CNSAg + NH_4NO_3$$

$$6\ CNSNH_4 + Fe_2(SO_4)_2 \longrightarrow 2\ Fe(CNS)_3 + 3\ NH_4SO_4$$

Reactivi

1. Sol. $AgNO_3$ 2,9063 g ‰
2. Sol. saturată permanganat de potasiu
3. HNO_3 conc.
4. Alaun feriamoniacal 5 g %
5. Glucoză cristale sau apă oxigenată
6. Sol. sulfocianură de amoniu 1,3011 g ‰

Modul de lucru

Intr-un balon Erlenmeyer ce conţine câţiva ml apă distilată se introduce cu micropipeta 0,1 ml ser, plasmă sau globule. Se adaugă 1 ml soluţie $AgNO_3$, 0,5 ml soluţie saturată de permanganat de potasiu şi 1 ml HNO_3 conc. Se fierbe 10 minute, timp în care are loc oxidarea materiilor organice. Totodată are loc şi precipitarea clorului sub formă de clorură de argint.

Pentru a putea titra excesul de $AgNO_3$ se decolorează permanganatul prin adăugarea a 1-2 picături de apă oxigenată sau a unei mici cantităţi de glucoză. Se răceşte, se adaugă 10 picături soluţie alaun feriamoniacal şi se titrează până la viraj roz cu sulfocianură de amoniu.

Calcul

1 ml $AgNO_3$ = 1 ml NH_4SCN = 0,001 g NaCl

(1 - N) x 0,001 x 1000 = g NaCl ‰ ml

Pentru a exprima în clor se înmulţeşte cantitatea de NaCl găsită cu 0,6068.

Valori de referinţă

Plasmă: 3,6 g Cl ‰ sau 5,8 g NaCl ‰

Hematii: 1,9 - 2,2 g Cl ‰

Raportul clor globular/clor plasmatic = 0,48-0,52.

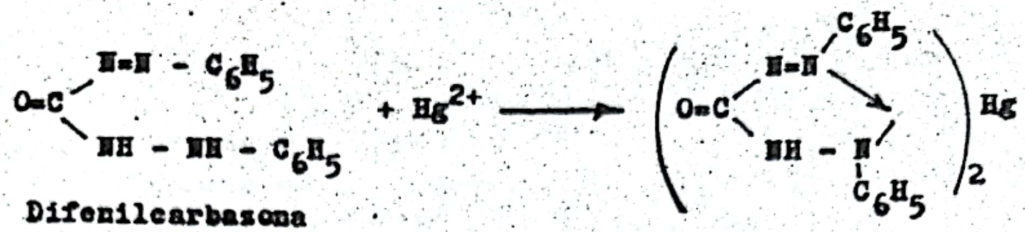
DOZAREA CLORURILOR IN SER

(Metoda O.Schales şi S.Schales)

Principiu

Ionii de clor formează cu ionii de mercur, clorura de mercur nedisociabilă ($HgCl_2$). Când toţi ionii de clor au fost fixaţi, excesul de ioni de Hg^{2+} formează cu difenilcarbazona o coloraţie violetă:

$$Hg(NO_3)_2 + 2\ NaCl \longrightarrow HgCl_2 + 2\ NaNO_3$$



Difenilcarbazona

Reactivi

1. Sol. nitrat mercuric 0,01 N (care se poate prepara şi cu ajutorul HgO)
2. Sol. acid sulfuric 2/3 N
3. Sol. alcoolică de difenilcarbazonă în alcool de 96 % ,0,250 g % (merge şi cu 0,125 g %).
4. Sol. etalon clorură de potasiu 0,1 N (7,455 g KCl p.a. se dizolvă în apă distilată şi se aduce la 1000 ml. Pentru conservare se adaugă 1 ml cloroform.

Modul de lucru

In următoarele baloane Erlenmeyer de 25 ml capacitate se pipetează:

	Proba 1 (ml)	Proba 2 (ml)	Etalon (ml)
Apă bidistilată	1	1	1
Ser, LCR	0,1	0,1	-
Sol. etalon	-	-	0,1
Sol. H_2SO_4	0,1	0,1	0,1
Indicator (difenil-carbazona) picături	2	2	2

Se agită şi se titrează cu soluţie de nitrat mercuric până la virajul spre violet.

Calcul

La 1 ml $Hg(NO_3)_2$ 0,01 N corespunde 0,355 mg Cl sau 0,584 mg NaCl.

N_p = ml $Hg(NO_3)_2$ consumaţi la titrarea probelor

N_E = ml $Hg(NO_3)_2$ consumaţi la etalon

$$\frac{N_p}{N_E} \cdot 355 = \text{mg Cl/100 ml}$$

$$\frac{N_p}{N_E} \cdot 583 = \text{mg NaCl/100 ml}$$

Valori de referinţă

Ser: 334 - 376 mg Clor/100 ml sau 96 - 106 mEq/l
LCR: 425 - 461 mg Clor/100 ml
Urină: 600 - 900 mg Clor/100 ml
Ser: 580 mg NaCl/100 ml
LCR: 700 - 760 mg NaCl/100 ml
Urină: 1000 - 1400 mg NaCl/24 ore

Observaţii

- Determinările trebuie făcute în cursul primelor 2 ore de la recoltarea sângelui sau se separă imediat serul de eritrocite pentru a evita schimbarea distribuţiei ionilor de Cl^- între ser şi eritrocite.

- Soluţia etalon este necesară pentru verificarea soluţiei de azotat mercuric şi pentru a pune în evidenţă sfârşitul titrării.

- Pentru dozarea în urină se face o diluţie de 1:1 şi apoi rezultatul se înmulţeşte cu 2.

- Reacţia are loc la pH=3, de aceea este necesară ajustarea pH-ului urinar cu acid sulfuric 2/3 N sau cu HNO_3 N.

- Serurile foarte icterice trebuie deproteinizate (0,1 ml ser cu 1 ml acid tricloracetic 5 %). In acest caz se va lua 1 ml supernatant la titrare, iar culoarea la viraj este albastră în loc de violet.

- Pentru serurile icterice se mai poate folosi defecarea :

- apă bidistilată	4 ml
- ser	0,5 ml
- H_2SO_4 2/3 N	0,25 ml
- tungstat de sodiu 10 %	0,25 ml

Se centrifughează şi se lucrează cu 1 ml supernatant (care corespunde la 0,1 ml ser). Virajul spre violet de la începutul titrării nu trebuie luat în consideraţie.

DOZAREA NaCl IN URINA
(Metoda Mohr)

Principiu

Clorul din urină este precipitat cu azotat de argint sub formă de clorură de argint insolubilă, cromatul de potasiu servind drept indicator al reacţiei.

Când întreaga cantitate de clor a fost consumată, prima

picătură în exces de azotat de argint formează cu cromatul de potasiu, cromatul de argint. Culoarea virează de la galben-citrin la roşu-cărămiziu:

$$AgNO_3 + NaCl \longrightarrow AgCl + NaNO_3$$

$$2\ AgNO_3 + K_2CrO_4 \longrightarrow Ag_2CrO_4\downarrow + 2\ KNO_3$$

pp. roşu-cărămiziu

Reactivi

1. Sol. cromat de potasiu 10 %
2. Sol. titrată de $AgNO_3$ 2,9063 g %o. Concentraţia de 2,9069 g $AgNO_3$ este calculată pentru a corespunde la 1 g NaCl %.

Modul de lucru

Intr-un balon Erlenmeyer de 25 ml se pipetează 2 ml apă distilată, 0,1 ml urină şi 2-3 picături de cromat de potasiu. Se titrează cu $AgNO_3$ până la apariţia culorii roşu-cărămiziu.

Este indicat ca înainte de terminarea titrării să se adauge o picătură de cromat de potasiu, pentru ca virajul să fie mai sensibil.

Din numărul de ml de $AgNO_3$ utilizaţi, se scade 0,03 ml corespunzător unei picături în exces care formează cromatul de argint. Pentru a avea o dozare precisă se lucrează cu un martor care conţine $AgNO_3$, cromat de potasiu şi NaCl în exces, pentru compararea culorii.

Calcul

1 ml sol. $AgNO_3$ = 0,001 g NaCl

N x 0,001 x 10000 = N x 10 = g NaCl %o

Valori de referinţă

1000 - 1200 mg NaCl /100 ml urină sau

120 - 200 mEq/l sau 10 - 15 g/24 ore

Interpretare

Eliminări crescute de clor au loc în:

- diaree
- insuficienţă renală cronică sau acută
- insuficienţă suprarenală (maladia ADDISON).

Scăderea clorului plasmatic = hipocloremii

- datorate depleţiilor clorate (în boli gastrointestinale, diaree, vomă);
- în tratamente cu diuretice

- insuficienţă renală
- acidoză cronică respiratorie (emfizem)
- acidoză diabetică
- alcaloză hipocloremică.

Cantităţi insuficiente de Cl^- în organism atrag o îngreunare a digestiei.

In carenţa de clor, are loc o reducere apreciabilă a contracţiei musculare.

Creşterea clorului plasmatic (hipercloremia):

- o consecinţă a unui aport crescut de sare
- în afecţiuni ce alterează eliminările (ex. în acidoza renală tubulară)
- datorită unei reabsorbţii crescute de clor în intestin
- în nefroze
- deshidratări
- hiperparatiroidism.

Creşterea cloremiei conduce la eliminări urinare a HCO_3^- (împreună cu Na^+) are loc o retenţie de H^+ ceea ce va duce la instalarea acidozei hipercloremice.

DOZAREA CATIONILOR METALICI

In ultimii ani, metodele de dozare a Na, K şi chiar Ca şi Mg,au fost înlocuite cu metoda flamfotometrică.

In lichide biologice (ser, plasmă, urină, LCR) dozarea acestor metale alcaline (Na şi K) şi alcalino-teroase (Ca şi Mg) se poate face pe baza spectrelor de emisie caracteristice fiecărui element. Acest lucru se realizează prin fotometria în flacără sau flamfotometrie, o metodă fizică rapidă, precisă, care necesită cantităţi mici de lichid biologic şi aparatură relativ simplă.

Serul sau plasma sunt diluate cu apă bidistilată şi pulverizate în curentul de gaz care alimentează flacăra aparatului. La o temperatură constantă a flăcării intensitatea radiaţiei emise este proporţională cu concentraţia metalului din soluţie. Liniile spectrale ale elementului urmărit sunt selecţionate prin intermediul unui filtru de selecţie (specific fiecărui metal) pe o celulă fotoelectrică unde se formează un fotocurent ce poate fi măsurat cu ajutorul unui galvanometru (vezi flamfotometria).

In lipsă de flamfotometru se continuă în unele laboratoare cu dozarea prin metode chimice.

Determinarea de N_a şi K în ser sau urină se poate face:

- flamfotometric (spectrometrie în flacără);
- spectrometrie cu absorbţie atomică;
- cu electrozi selectivi de ioni.

Valori de referinţă:

Sodiu în ser:	315 - 350 mg/100 ml
	135 - 145 mEq/l
în urină:	170 mEq/24 ore (în regim desodat)
salivă:	23 - 57 mg/100 ml
Potasiu în globule:	3,4 - 5,95 g/100 ml
	134 - 248 mEq/l
în ser:	16 - 22 mg/100 ml
	3,5 - 5 mEq/l
în urină:	100 - 400 mg/100 ml
	40 - 50 mEq/l

Interpretare pentru N_a şi K

Scăderea N_a plasmatic (hiponatremii):

- arsuri grave;
- după administrare de diuretice;
- insuficienţă corticosuprarenală;
- nefrită cronică (cu pierdere de sare);
- diabet zaharat cu acidoză;
- insuficienţă cardiacă;
- insuficienţă renală;
- diaree severă, etc.

Creşterea concentraţiei plasmatice (hipernatremia) în:

- stări febrile;
- encefalite, leziuni traumatice cerebrale;
- corticoterapie.

Eliminări scăzute de N_a în urină:

- sindrom Coushing;
- filtrare glomerulară diminuată;
- pierdere de N_a prin tractusul gastro-duodenal.

Eliminări crescute de Na în urină:

- insuficienţă corticosuprarenală;
- insuficienţă renală (nefrită);

- edem cerebral;
- supra producţie de aldosteron.

Hipokalemia (hipopotasemia); se traduce clinic prin tulburări neuromusculare şi cardiace; Este asociată cu alcaloza metabolică.

Aceste scăderi au loc în:

- absorbţie deficitară, în vome, diaree,
- terapie cu diuretice;
- deficite tubulare renale;
- în sindroamele digestive chirurgicale (obstrucţie intestinală);
- sindroame toxice (în gastroenterite la sugari);
- coma diabetică, coma hipoglicemică.

Hiperkalemia este mai rară dar mai gravă:

- în insuficienţă renală;
- hipoaldosteronism.

Hiperkalemia se instalează insidios şi poate ajunge la accidente grave ireversibile, cu paralizie fără abolirea reflexelor şi oprirea inimii în diastolă.

Aceasta se poate produce prin insuficienţa corticosuprarenală, insuficienţa renală gravă în sindrom hemolitic.

Eliminări renale crescute:

- tratamente cu diuretice;
- sindrom Coushing, tratament cu steroizi;
- perfuzii cu soluţii lipsite de potasiu.

DOZAREA COMPLEXOMETRICA A Ca şi Mg DIN SER

Principiu

Ionii de Ca şi Mg formează complexe coordinative stabile cu EDTA (etilendiamin-tetraacetat de sodiu) denumit comercial complexon III.

In serul total se dozează Ca şi Mg. Paralel se face o altă probă pentru Mg cu ser din care Ca a fost precipitat cu oxalat de amoniu. Prin diferenţă se obţine cantitatea de Ca.

Reactivi

1. Sol. tampon sulfamat de amoniu:

- sulfamat de amoniu	0,8 g
- apă bidistilată	20 ml
- amoniac până la	100 ml

2. Sol. indicator:
   - roşu de metil 15 mg
   - eriocrom T 50 mg
   - alcool absolut până la 100 ml
3. Sol. EDTA 0,372 g ‰
4. Sol. clorură de calciu 100 mg ‰
   - $CaCO_3$ 0,250 g
   - HCl N până la solvire
   - apă dist. până la 1000 ml

   Soluţia se neutralizează.
5. Acid oxalic 0,2 N
6. Amoniac

Modul de lucru

Intr-o eprubetă de centrifugă se introduc 1 ml ser, 1 ml acid oxalic şi 0,6 ml apă distilată, se agită şi se lasă în repaus 5 minute. Se adaugă 0,4 ml amoniac şi se lasă apoi în repaus o oră după care se centrifughează la 2000-3000 t/min timp de 15 minute.

In trei pahare Berzelius de 50 ml, notate cu A, B, şi C se pipetează:

	A (Ca + Mg) (ml)	B (Mg) (ml)	C (Etalon) (ml)
Ser	0,5	-	-
Supernatant	-	1,5	-
Sol. $CaCl_2$	-	-	0,5
Sol. tampon	0,5	0,5	0,5
Indicator (picături)	4-5	4-5	4-5

Se titrează cu sol. EDTA până la viraj verde. Se notează:

N = ml EDTA necesari pentru proba A

N' = ml EDTA necesari pentru proba B

n = ml EDTA necesari pentru proba C

N - N' = ml EDTA necesari pentru dozarea Ca.

Calcul

Pentru calciu:

$$\frac{N - N'}{n} \times 0,05 \times 2000 = \text{mg Ca la 1000 ml ser}$$

Pentru magneziu

Dacă 1 mol Ca(40) . . . . . 1 mol Mg(24)
0,05 mg C_a X

$$X = \frac{0,05 \times 24}{40} = 0,03 \text{ mg Mg corespunzător cantității de calciu din proba etalon.}$$

$$\frac{E'}{n} \times 0,03 \times 2000 = \text{mg Mg la 1000 ml ser}$$

Valori de referință

Calciu: 9 - 10 mg % ml ser; 4,5 - 5,5 mEq/l

Magneziu: 1,9 - 2,5 mg % ml ser; 1,5 - 2 mEq/l

DOZAREA COMPLEXOMETRICA A Ca și Mg IN URINA

Principiu

Este același ca și la dozarea complexometrică a Ca și Mg în ser.

Reactivi

1. Sol. EDTA 0,186 g ‰
2. Sol. alcoolică roșu de metil 0,030 g %
   In momentul întrebuințării se diluiază 1:20 în alcool.
3. Sol. alcoolică eriocrom T 0,103 g %
   In momentul întrebuințării se diluiază 1:20 în alcool.
4. Sol. oxalat de sodiu:
   - oxalat de sodiu 6,7 g
   - apă bidistilată 500 ml
   - roșu de metil 2-3 pic.
   - acid acetic până la viraj roz
   - apă bidistilată până la 1000 ml
5. Sol. tampon pH=10,8
   - acid sulfamic 1 g
   - piperazină 23 g
   - apă bidistilată 100 ml
6. Sol. etalon calciu 100 mg ‰
   - $CaCO_3$ 0,250 g
   - HCl până la solvire
   - apă bidistilată până la 1000 ml
7. Acid acetic 10 %

Modul de lucru

Intr-un balon cotat de 25 ml se introduc 5 ml urină şi 10 ml apă distilată, se adaugă acid acetic 10 % până la coloraţia roz, în prezenţa roşului de metil (pH=5,5). Se completează până la 25 ml cu apă distilată. Intr-o eprubetă de centrifugă se iau 1-2 ml urină diluată şi aceeaşi cantitate de oxalat de sodiu, se lasă în repaus o oră şi se centrifughează la 2000 - 3000 t/min.

In trei pahare Berzelius de 50 ml, notate cu A,B, şi C se pipetează:

	A (Ca + Mg) ml	B (Mg) ml	C (Etalon) ml
Urină diluată	1	-	-
Supernatant	-	2	-
Etalon calciu	-	-	0,5
Roşu de metil diluat	1	1	1
Eriocrom diluat	1	1	1
Tampon	0,5	0,5	0,5

Se titrează cu EDTA până la viraj verde.

Se notează:

N = ml EDTA necesari pentru proba A

N' = ml EDTA necesari pentru proba B

n = ml EDTA necesari pentru proba C

Calcul

Pentru calciu

$\frac{N - N'}{n} \times 0,05 \times 5 \times 1000$ = mg Ca la 1000 ml urină

Pentru magneziu

Dacă: 1 mol Ca(40) . . . . . 1 mol Mg(24)

0,05 mg Ca X

X = 0,03 mg Mg corespunzător cantităţii de Ca din proba etalon.

$\frac{N'}{n} \times 0,03 \times 5 \times 1000$ = mg Mg la 1000 ml urină

Valori de referinţă

Calciu: 100 - 400 mg/24 ore; 5 - 10 mEq/24 ore

Magneziu: 50 - 100 mg /24 ore

Observaţii

Dacă urina conţine depozit de oxalat de Ca şi Mg, aceasta

este redizolvat cu o cantitate minimă de HCl, după care urina se filtrează.

Interpretare

Hipocalcemia este legată de sindromul de tetanie.

Hipocalcemia se manifestă prin creşterea excitabilităţii neuromusculare, fenomene de tetanie (la copii sunt înso ţite de accese de cianoză, vomă).

Cauzele hipocalcemiei sunt multiple:

- rahitism
- hipoparatiroidism
- insuficienţă renală cronică
- pancreatită acută.

Hipercalcemii

In distrugeri (decalcifiere) ale ţesutului osos, eliminările de C_a pot provoca leziuni ale tubilor renali.

Cauzele hipercalcemiei:

- hiperparatiroidism
- afecţiuni neoplazice
- osteoliza malignă
- sarcoidoza.

In hipercalcemie apar sindroame cardiovasculare asociate cu nefropatie hipercalcică cu litiază şi nefrocalcinoză provocând eliminări crescute de apă, ioni de Na şi K - poliurie şi sete puternică.

DOZAREA MAGNEZIULUI

In lichidele biologice Mg^{++} se poate doza:

- prin spectrofotometrie de absorbţie atomică - este specifică şi foarte sensibilă;
- fotometrie de flacără (flamfotometru), dar cu filtre speciale pentru magneziu;
- metoda fluorimetrică este specifică, sensibilă şi rapidă, însă necesită aparatură specială;
- tehnicile chimice cu pp. Mg nu sunt suficient de exacte;
- metoda cea mai bună este colorantul Mann şi Yoe, un reactiv specific pentru Mg (metodă rapidă şi sensibilă) care la pH alcalin formează cu Mg (în cantităţi foarte mici) un complex de culoare roşie. Prin această metodă nu este necesară deprotei-

nizarea;

- metoda cu galben de titan.

Normal 30 % din magneziul seric este legat de proteine, 50-60 % se găseşte sub formă ionizată şi 10 - 15 % sub formă de complecşi

DOZAREA Mg CU GALBEN DE TITAN

In soluţie alcalină, Mg^{++} din ser formează particule coloidale de $Mg(OH)_2$. Colorantul galben de titan formează cu aceste particule (pe care va fi absorbit) un complex colorat în roşu. Stabilizarea culorii se realizează prin adăugarea unei soluţii macromoleculare de gumă arabica sau de alcool polivinilic.

Reactivi

1. Acid tricloracetic 20 %
2. Sol. galben de titan 0,05 g % în apă distilată (GM=695,73). Soluţia se păstrează timp de o săptămână la + 4°C.
3. Stabilizator: soluţie gumă arabică sau alcool polivinilim 0,1 g % în apă distilată.
4. Sol. etalon stoc: se dizolvă 1,0135 g $MgSO_4.7H_2O$ în 100 ml H_2SO_4 0,1 N. Această soluţie conţine 1 mg Mg^{++}/ml. Se conservă timp de 3 luni la +4°C.
5. Sol. etalon de lucru: se diluiază în momentul întrebuinţării 1 ml din sol. stoc la 100 ml apă distilată realizând o concentraţie de 1 mg Mg^{++}/ 100 ml.
6. Sol. NaOH 4 N (16 g %).

Modul de lucru

Deproteinizarea

Intr-o eprubetă de centrifugă se pipetează:

- Apă distilată	2 ml
- Ser	1 ml
- Acid tricloracetic	1 ml

Se lasă în repaus 10 minute, apoi se centrifughează la 3000 t/min. timp de 5 - 8 minute.

Dozarea

In trei eprubete se pipetează:

	P (ml)	S (ml)	M (ml)
Supernatant ser	2	-	-

	P (ml)	E (ml)	M (ml)
Sol. etalon de lucru	-	1	-
Apă distilată	-	1	2
Stabilizator	1	1	1
Galben de titan	0,5	0,5	0,5
Sol. NaOH	1	1	1

Se agită fiecare probă şi se lasă 30 de minute în repaus la temperatura camerei. Se citeşte extincţia probei şi a etalonului faţă de martor la 540 nm în cuva de 1 cm.

Calcul

Cei 2 ml supernatant conţin 0,5 ml ser

Concentraţia etalonului este de 1 mg Mg^{++}/100.

$\frac{E_P}{E_E} \times 1 \times 2$ = mg Mg^{++}/100 ml ser

Valori normale

Adulţi: 1,5 - 3,5 mg/100 ml ser; 1,25- 2,9 mEq/l

Copii: 1,6 - 2,4 mg Mg^{++}/100; 1,3 - 2,0 mEq/l

Utilitate diagnostică

In tulburări de calcifiere, tetanie, sindroame neuropsihice.

Scăderi ale Mg^{++} se constată în urma diareelor, vărsăturilor, în unele cazuri de hiperparatiroidism, în hiperaldosteroism, după diuretice şi în unele ciroze alcoolice în special în crizele de delirum tremens, în coma diabetică, pancreatită.

Creşteri ale Mg^{++} seric se întâlnesc rar: în insuficienţa renală acută şi cronică, în nefrite, hipertiroidism.

Depleţii de Mg (eliminări excesive) se întâlnesc în stress, neoplazii, pancreatite, arsuri.

O depleţie mare de Mg este însoţită de perturbarea homeostaziei K şi Ca: micşorarea retenţiei celulare a K şi creşterea extracţiei urinare, scăderea pronunţată a Ca seric, chiar la un aport normal de Ca.

Retenţia de Mg (reţinerea) se întâlneşte în acidoza diabetică netratată, în infecţii cronice, rahitism.

DOZAREA FOSFORULUI ANORGANIC IN SER

(Metoda Bell Doisy Briggs - modificată)

Principiu

Fosforul anorganic din ser formează împreună cu acidul molibdic, acidul fosfomolibdic, care este redus de acidul ascorbic în albastru de molibden. Culoarea obţinută este comparată cu cea a unei soluţii standard de fosfat, tratată în aceleaşi condiţii.

Reactivi

1. Sol. acid tricloracetic 20 %
2. Sol. acid molibdic:
   a) sol. molibdat de amoniu 25 g
      apă distilată 300 ml
   b) sol. acid sulfuric:
      apă distilată 125 ml
      acid sulfuric 75 ml

După solvirea molibdatului şi răcirea soluţiei de acid sulfuric se amestecă soluţiile (a) şi (b) şi se completează la 500 ml cu apă distilată.

3. Sol. acid ascorbic 1 % în HCl N/10
4. Sol. fosfat acid de potasiu (KH_2PO_4) 0,4394 g %o

Din această soluţie se iau 25 ml şi se completează la 200 ml cu apă distilată: 2 ml din această soluţie corespund la 0,025 mg fosfor.

Modul de lucru

Intr-o eprubetă de centrifugă se măsoară 2 ml ser. Se adaugă 2 ml acid tricloracetic. Se amestecă bine cu o baghetă. Se lasă în repaus 5 minute. Se centrifughează.

In următoarele eprubete de reacţie se pipetează:

	Proba (ml)	Etalon (ml)	Martor (ml)
Supernatant	2	-	-
Etalon	-	2	-
Acid molibdic	2	2	2
Acid ascorbic	0,5	0,5	0,5
Apă distilată	5,5	5,5	7,5

Se agită eprubetele, apoi se citeşte densitatea optică a probei şi a etalonului faţă de martor la 630 nm.

Calcul

$\frac{E_P}{E_E}$ x 0,025 x 100 = mg fosfor la 100 ml ser.

Valori de referinţă

Ser adulţi: 3,5 mg fosfor % ml ser
Ser copii: 5,0 mg fosfor % ml ser.

Interpretare

Hipofosfatemie apare în:

- osteomalacie
- rahitism
- diabet fosfatic renal
- rahitism renal când au loc pierderi renale de fosfor.

Hiperfosfatemii:

- insuficienţă renală
- hipoparatireoidism
- osteoporoză
- insuficienţă renală cronică
- coma diabetică.

DOZAREA FOSFORULUI IN URINA

Principiu

Fosfaţii din urină sunt precipitaţi la cald cu azotatul de uranil. Acidul azotic eliberat din reacţia de mai sus, este neutralizat prin adăugare de acetat de sodiu. Sfârşitul reacţiei se pune în evidenţă cu tinctură de cochenilă, care atunci când întreaga cantitate de fosfat a precipitat, dă cu azotatul de uranil un complex de culoare verde:

$$UO_2(NO_3)_2 + NaH_2PO_4 \longrightarrow UO_2HPO_4 + NaNO_3 + HNO_3$$

Reactivi

1. Sol. azotat de uranil:
   - azotat de uranil 40 g
   - apă distilată 600 ml

Se solvă. Se adaugă apoi, până la tulburare persistentă, amoniac picătură cu picătură. După aceea se adaugă acid acetic glacial picătură cu picătură, până la solvirea completă a precipitatului. Se completează apoi cu apă distilată până la 1000 ml.

2. Sol. Joulie:
   - acetat de sodiu 100 g
   - acid acetic glacial 50 ml
   - apă distilată până la 1000 ml
3. Sol. etalon fosfat de amoniu 3,24 g ‰
4. Tinctură de cochenilă în alcool 96° sol.saturată.

Modul de lucru

- Determinarea titrului soluţiei de azotat de uranil:

Intr-o capsulă de porţelan se pipetează:
- sol. etalon 5 ml
- sol. Joulie 0,5 ml
- tinctură de cochenilă 1 pic.

Se încălzeşte la fierbere. Se agită cu o baghetă de sticlă. Se titrează în timpul fierberii, cu azotat de uranil, până la apariţia culorii verzi. Se notează numărul de ml de azotat de uranil utilizaţi cu (n).

50 ml sol. $NH_4H_2PO_4$ = 0,10 g P_2O_5

Dacă (n) ml azotat de uranil, cât s-au întrebuinţat, corespund la 0,10 g P_2O_5, atunci numai 1 ml din soluţia de azotat de uranil corespunde la 0,10/n = g P_2O_5.

Rezultatul acestui raport este titrul soluţiei de azotat de uranil şi indică cantitatea de P_2O_5 corespunzătoare la 1 ml din soluţia de azotat de uranil.

DOZAREA FOSFAŢILOR IN URINA

Intr-o capsulă de porţelan se pipetează:
- Urină 10 ml
- Sol. Joulie 1 ml
- Tinctură de cochenilă 4 pic.

Se încălzeşte la fierbere. Se titrează cu azotat de uranil până la culoare verde.

Calcul

N x titrul sol. de azotat de uranil x 100 = g P_2O_5/1000 ml urină.

Valori de referinţă

1 - 5 g fosfor/24 ore

2 - 4 g /1000 ml urină exprimat în P_2O_5

Pentru a se exprima în acid ortofosforic se înmulţeşte cu 14 valoarea P_2O_5.

Eliminări crescute în rahitism şi în hiperparatiroidism.

Scanned with OKEN Scanner

REZERVA ALCALINĂ

Noţiunea de rezervă alcalină ar trebui să cuprindă totalitatea alcaliilor pe care sângele îi poate pune la dispoziţia acizilor care ajung în circulaţia sanguină şi care trebuie să fie neutralizaţi pentru a nu se modifica pH-ul sanguin. În mod curent sub această denumire se înţelege numai cantitatea de bicarbonaţi din sânge, respectiv alcalii puşi la dispoziţie de bicarbonaţi.

În explorarea echilibrului acido-bazic se pot folosi microechipamente Astrup. Această metodă are ca principiu reacţia inversproporţională între presiunea parţială a CO_2 (P_{CO_2}) şi valorile de pH din sânge. În lipsa acestui echipament se folosesc metode rapide de determinare prin titrare.

Clinic nu se determină bicarbonaţii ca atare, ci cantitatea de CO_2 din bicarbonaţi.

După Van Slyke şi Cullen se înţelege prin "rezervă alcalină" cantitatea de CO_2 în ml la 0°C şi 760 mm Hg în 100 ml plasmă.

Utilizarea denumirii de rezervă alcalină numai pentru cantitatea de bicarbonaţi din sânge este îndreptăţită, deoarece valoarea bicarbonaţilor (raportul bicarbonat/acid carbenic) determină valoarea pH-ului sanguin şi este rezultanta celeilalte tuturor sistemelor tampon din sânge. Prin determinarea bicarbonaţilor se poate obţine o imagine asupra întregului echilibru acido-bazic din organism.

Principiu

Prin adăugarea unei cantităţi determinate de acid azotic în ser sau plasmă, se pune în libertate CO_2 legat de alcali, iar excesul de acid se retitrează cu o soluţie de NaOH 0,1 N până la neutralizare.

Diferenţa dintre cantitatea de acid şi cantitatea de NaOH 0,1 N utilizată la titrare reprezintă valoarea rezervei alcaline.

Reactivi

1. Sol. etalon de carbonat de sodiu 25 mEq/l
2. Acid azotic 0,1 N (se verifică cu soluţie de Na_2CO_3)
3. NaOH 0,1 N (se verifică cu soluţie de HNO_3 0,1 N)
4. Sol. indicator roşu de fenol: 0,04 g % în alcool, 60°.

Modul de lucru

Intr-un balon Erlenmeyer se măsoară 10 ml apă distilată, 1 ml ser sau plasmă, se adaugă 0,7 ml sol. HNO_3 0,1 N, se agită timp de 2 minute, se adaugă 5 picături roşu de fenol, se titrează cu NaOH 0,1 N până la coloraţie roşie-vişinie.

Calcul

(0,7 - N) x 100 = mEq/l, în care

N = numărul de ml de sol. NaOH 0,1 N utilizaţi la titrare.

Deci, diferenţa dintre 0,7 ml HNO_3 0,1 N şi ml de NaOH 0,1 N utilizaţi la titrare, înmulţită cu 100 reprezintă rezerva alcalină exprimată în mEq/l.

Valori de referinţă

27 mEq/l (22 - 29 mEq/l).

Scanned with OKEN Scanner

ANALIZA BIOCHIMICA A URINII

Determinările calitative se pot efectua pe urină proaspătă când cercetăm elementele patologice şi sedimentul urinar.

Determinările cantitative se execută însă pe urina din 24 ore recoltată cu antiseptic.

Recoltarea se face în felul următor: prima urină de dimineaţă se aruncă şi apoi începând de ex. de la ora 8 dimineaţa până a doua zi la aceeaşi oră, se colectează toate emisiunile într-un vas curat, cu antiseptic (timol, toluol, oxicianură de mercur soluţie 1 %) pentru a împiedica fermentaţia.

Examenul fizic al urinii

Aspectul

In mod normal, urina este limpede. Dacă la emisie ea este clară dar se tulbură prin răcire formând un precipitat ce se depune sub formă de depozit, aceasta indică prezenţa fosfaţilor de calciu şi magneziu, carbonaţi sau uraţi acizi.

Unele urini, însă, pot fi tulburi chiar la emisie datorită prezenţei puroiului, hematiilor, celulelor epiteliale.

Deoarece pe urinile tulburi nu se fac analize, trebuie ca mai întâi să o clarifiem. Prin filtrare şi centrifugare se pot îndepărta elemente ca: leucocite, hematii, epitelii, cilindri.

Urinile acide pot prezenta un depozit roz datorită uratului amorf ce se solvă la încălzire.

In urinile alcaline, un depozit gros, albicios, indică prezenţa fosfaţilor. In acest caz urina se acidifică cu acid acetic 1/10.

O urină tulbure datorită bacteriilor se poate clarifica prin agitare cu talc şi apoi filtrare.

Numai determinarea aciditaţii urinare se va face întotdeauna asupra urinii ca atare, deoarece adăugarea de acid sau bază modifică aciditatea.

Culoarea

In mod normal urina are o culoare galben roşiatică datorită pigmenţilor existenţi: urocromul, urobilina, uroeritrina, porfirina. Intensitatea coloraţiei poate fi în funcţie de concentrarea ei şi de pH. Urinile acide au culoarea mai închisă spre deosebire de cele alcaline care sunt mai palide.

Urina capătă o culoare brună când pigmenţii biliari sunt prezenţi, roşietică dacă conţine sânge sau în urma administrării unor medicamente ca piramidon, aspirină etc.

In insuficienţa renală gravă se elimină o urină palidă ca urmare a pierderii capacităţii rinichiului de a transforma cromogenii în pigmenţi.

Mirosul

Mirosul urinii este caracteristic, uşor aromatic datorită acizilor volatili sau existenţei unei substanţe numită "urinod". El este slab la emisie şi se dezvoltă în timp. Prezenţa corpilor cetonici în urină îi imprimă un miros de fructe, iar după ingestia de sparanghel apare un miros neplăcut şi pronunţat.

Volumul

In mod normal volumul urinii variază în 24 de ore cu cantitatea de lichide ingerate precum şi cu eliminarea de apă pe alte căi: transpiraţie, intestin, plămân.

La omul adult cantitatea de urină din 24 ore este cuprinsă între 1200-1500 ml. Cantitatea de urină poate creşte în anumite stări patologice ca: diabet, scleroză renală, sau poate scădea foarte mult în: nefroze, nefrită toxică, diaree.

Densitatea

Ea variază în mod normal între 1015-1025; poate varia în funcţie de apa ingerată şi eliminată pe altă cale decât rinichii. Normal la un volum mare, densitatea scade, iar la un volum mic ea creşte. Găsim o excepţie în diabetul zaharat în care cu toate că volumul este crescut, densitatea este şi ea crescută datorită eliminării de glucoză.

Determinarea densităţii urinare se face obişnuit cu ajutorul urodensimetrului. Se toarnă cu grijă pentru a nu face spumă, într-un cilindru cu un diametru mai mare ca al urodensimetrului, pentru a nu împiedica plutirea acestuia şi de a nu adera de pereţi. Citirea se face în aşa fel încât nivelul superior al lichidului să fie la nivelul ochilor. Gradaţiile urodensimetrului sunt socotite pentru temperatura de 15°C. Dacă urina are o temperatură mai ridicată de 15°C, se adaugă 0,001 pentru fiecare 3°C în plus şi se scad 0,001 pentru fiecare 3° în minus.

Prezenţa albuminei, modifică densitatea urinii numai dacă ea depăşeşte 7 g %o. In acest caz se vor scădea câte 0,03 de fieca-

re gram de proteină în plus.

pH-ul urinii

In mod normal reacţia urinii este uşor acidă, pH-ul ei fiind cuprins între 5,8 - 6. pH-ul urinii variază în funcţie de regimul alimentar. Un regim bogat în carne produce o scădere a pH-ului iar unul vegetarian produce o creştere a alcalinităţii.

Cercetarea pH-ului urinar se poate face prin mai multe metode:

1. Cu hârtie de turnesol.

Se înmoaie o hârtie de turnesol roşie şi una albastră în urină. Urina acidă înroşeşte hârtia albastră iar una alcalină albăstreşte hârtia roşie de turnesol. La neutralitate culoarea hârtiei nu se modifică.

2. Metoda colorimetrică (Guillaumin)

Principiu

Se determină colorimetric pH-ul urinii faţă de o scară cu pH-uri cuprinse între 4,6 - 7,4.

Reactivi

1. Indicator roşu de metil
   - roşu de metil mojarat 0,025 g
   - alcool de 96° 60 ml
   - apă distilată 40 ml
2. Indicator albastru de bromtimol
   - albastru de bromtimol 0,08 g
   - NaOH N/20 1,9 ml
   - alcool de 96° 10 ml
   - apă distilată 88 ml
3. Sol. KH_2PO_4 M/15 9,078 g ‰
4. Sol. $Na_2HPO_4 . 12\ H_2O$ 23,86 g %

Scara etalon:

Se iau 8 eprubete de acelaşi diametru. Se numerotează. In fiecare eprubetă se introduc cantităţile de fosfaţi indicate în tabel.

Nr.eprubetei	Sol.KH_2PO_4 ml	Sol.Na_2HPO_4 ml	pH-ul
1	10	-	4,6
2	9,85	0,15	5,0
3	9,55	0,45	5,4
4	9,15	0,85	5,8
5	8,05	1,95	6,2
6	6,30	3,70	6,6
7	3,70	6,30	7,0
8	1,90	8,10	7,4

Se introduce în fiecare eprubetă câte 5 picături soluţie roşu de metil şi 5 picături soluţie albastru de bromtimol.

Se închid eprubetele cu dop de cauciuc, se parafinează şi se păstrează la întuneric.

Modul de lucru

Intr-o eprubetă de acelaşi diametru cu cele din scară, se pun 10 ml urină. Se introduc 5 picături roşu de metil şi 5 picături de albastru de bromtimol. Se agită şi se compară cu scara de pH şi se citeşte direct valoarea pH-ului.

EXAMENUL CHIMIC AL URINII

Cercetarea calitativă a proteinelor

1. Metoda cu acid acetic la cald

Intr-o eprubetă se iau 5 ml urină filtrată sau centrifugată. Se încălzeşte urina la partea superioară. Dacă apare o tulburare, aceasta poate fi datorată a două cauze: precipitarea fosfaţilor sau precipitarea proteinelor. Pentru diferenţiere se adaugă câteva picături de acid acetic glacial. Dacă precipitatul dispare, înseamnă că era datorat fosfaţilor iar dacă precipitatul persistă, înseamnă că sunt proteine.

2. Metoda cu acid azotic (Heller)

Principiu

Proteinele precipită cu acid azotic concentrat.

Modul de lucru

Intr-o eprubetă de hemoliză se ia 1 ml de acid azotic conc.

şi cu ajutorul unei pipete se prelinge pe pereţii interiori ai eprubetei , cu atenţie, 1 ml urină filtrată în aşa fel încât cele două lichide să nu se amestece. Dacă la limita de separaţie a celor două straturi apare un inel alb de precipitare, înseamnă că proteinele sunt prezente.

Pseudoalbuminele pot da un inel de precipitare deasupra liniei de separare a celor două lichide.

3. Metoda Esbach

Principiu

Albuminele precipită cu reactivii alcaloizilor, de exemplu, acid picric în prezenţa acidului citric.

Reactivi

1. Reactiv Esbach:

- acid picric 10 g
- acid citric 20 g
- apă distilată 1000 ml

Modul de lucru

La 1 ml urină filtrată se adaugă 1 ml reactiv Esbach. Apariţia unui precipitat indică fie prezenţa proteinelor, fie prezenţa pseudoalbuminelor. Dacă prin încălzire precipitatul dispare înseamnă că au fost pseudoalbumine, iar dacă precipitatul persistă el se datorează proteinelor.

Proteinurii patologice apar în afecţiuni renale, boli ale căilor urinare, stări febrile, intoxicaţii, boli cardiace, icter, traumatisme cerebrale, hemoragii cerebrale.

Cercetarea sângelui şi a hemoglobinei în urină

Se poate face prin metodele:

- microscopice (se pune în evidenţă prezenţa hematiilor în sedimentul urinar)
- spectroscopice (cercetarea hemoglobinei)
- metode chimice (urmărind proprietăţile peroxidazice a hemoglobinei sau a hematiei). Una din reacţii este cea cu benzidină.

Reacţia cu benzidină

Sângele descompune apa oxigenată cu eliberare de oxigen activ care în prezenţă de acid acetic oxidează benzidina.

Reactivi:

1. Acid acetic glacial
2. Apă oxigenată 3 %
3. Benzidină

Modul de lucru

Intr-o eprubetă se măsoară 0,5 ml acid acetic şi 0,5 ml apă oxigenată la care se adaugă câteva cristale de benzidină. Se introduc apoi câteva picături de urină. Dacă apare o coloraţie albastră (spre verde) în urina respectivă se elimină sânge (Hb sau eritrocite).

Interpretare

Prezenţa Hb sau a eritrocitelor în urină are loc în afecţiuni renale şi în unele afecţiuni extrarenale:

- litiază renală
- glomerulonefrită cronică
- glomerulonefrită acută infecţioasă şi toxică
- rinichi mobil
- tuberculoză renală
- hemoglobinurie paroxistică

Cercetarea glucozei
(Reacţia Benedict)

Principiu

Se bazează pe reacţia de reducere a cuprului:

$$CuSO_4 + 2\ NaOH \longrightarrow Cu(OH)_2 + Na_2SO_4$$

$$Cu(OH)_2 + C_6H_2O_6 \xrightarrow{-2H_2O} C_6H_{12}O_7 + CuO$$

Reactivi

1. Reactiv Benedict:

Sol. A.	-citrat de sodiu	85 g
	-carbonat de sodiu	50 g
	- apă distilată	400 ml
Sol. B.	- sulfat de cupru	8,5 g
	- apă distilată	50 ml

Se amestecă soluţiile A şi B şi se filtrează.

Modul de lucru

Se iau într-o eprubetă 2 ml reactiv Benedict şi 2-4 picături urină. Fierbem 2 minute sau punem la baia de apă 5 minute. Dacă soluţia conţine glucoză se va obţine un precipitat a cărui culoare ne va indica cantitatea de glucoză în mod aproximativ:

- până la 1 g glucoză %o - opalescenţă verde
- 10 - 20 g glucoză %o - precipitat galben
- peste 25 g glucoză %o - precipitat roşu.

Glicozurii patologice apar în:

- diabet zaharat, diabet renal
- afecţiuni hepatice, hipertiroidism

Galactozurii apar de obicei la sugari.

Fructozurii apar în perioada de sarcină.

Cercetarea acetonei

(Metoda Imbert-Bennamour)

Principiu

Acetona cu amoniacul şi cu nitriprusiatul de sodiu dă o culoare roşie-violacee.

Reactivi

1. Acid acetic glacial
2. Sol. nitroprusiat de sodiu 10 g %
3. Amoniac conc.

Modul de lucru

Într-o eprubetă se iau 5 ml urină, 5 picături de acid acetic glacial şi 5 picături din soluţia de nitroprusiat de sodiu. Se agită. Se lasă apoi la suprafaţa lichidului, cu precauţie ca să nu se amestece, 10 picături de amoniac conc. În caz că acetona este prezentă, se observă un inel roşu-violet la limita de separare între cele două lichide.

Observaţii

Reacţia poate fi dată şi de unele substanţe medicamentoase, ca de exemplu salicilatul, aspirina etc. Pentru diferenţiere se vor lua în eprubetă 5 ml urină care se vor fierbe. Prin fierbere acetona dispare. Dacă, făcându-se proba după fierbere, reacţia este negativă, înseamnă că reacţia pozitivă a fost dată de acetonă.

In urina normală sunt cantităţi mici de corpi cetonici. Eliminări crescute ale acestora au loc în:

- diabet zaharat
- inaniţie, sau în regim alimentar dezechilibrat (bogat în lipide şi proteine şi sărac în glucide).
- stări febrile
- tulburări gastro-intestinale acute sau cronice la copii
- vărsături accentuate în perioada de sarcină.

CERCETAREA PIGMENTILOR BILIARI

Cercetarea urobilinogenului

Principiu

Reactivul Ehrlich (p-dimetilamino-benzaldehidă) formează cu urobilinogenul un complex de culoare roşie.

Reactivi

1. Reactiv Ehrlich:
   - p-dimetilamino-benzaldehidă 2 g
   - acid clorhidric 20 % 200 ml

Modul de lucru

Intr-o eprubetă se iau câţiva ml de urină şi se adaugă câteva picături de reactiv Ehrlich. Dacă în 1-2 minute nu apare o coloraţie roşie, se încălzeşte puţin pe baia de apă. Apariţia culorii roşii indică prezenţa urobilinogenului.

Această culoare roşie poate fi dată şi de diferite substanţe ca: sulfamide, indican etc., de aceea pentru a fi siguri că este urobilinogen se va controla urina spectrofotometric. In prezenţa urobilinogenului apare o bandă de absorbţie în galben.

In mod normal urina conţine urobilinogen în cantitate foarte mică, 20 - 25 mg în urina din 24 ore, totuşi suficientă pentru a da reacţia pozitivă.

Observaţii

Reacţia pentru urobilinogen va fi făcută imediat după emisia urinei, deoarece în contact cu aerul, urobilinogenul se oxidează în urobilină.

Dintre pigmenţii biliari, bilirubina se elimină în urina numai în cazuri patologice (icter hepatic şi obstructiv).

Eliminări crescute de urobilinogen au loc în icter hepatic, icter hemolitic, în tumori maligne hepatice, abces hepatic.

In icterul prin obstrucţie urobilinogenul este absent în urină.

CERCETAREA INDICANULUI IN URINA

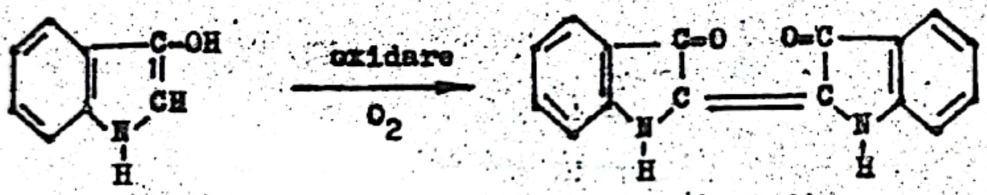
(Reacţia Jaffé)

Derivaţii de indol (rezultaţi din degradarea triptofanului sub acţiunea bacteriilor intestinale), se elimină în urină sub formă conjugată:

- indoxil sulfat de K (indican)
- indoxil glicuronat (în cantităţi mici).

Principiu

Indicanul în prezenţa acidului clorhidric este oxidat de clorura de calciu, apă oxigenată sau permanganat de potasiu, în indigo albastru care colorează cloroformul în albastru.



Indoxil — Albastru de indigo

Reactivi

1. Cloroform
2. Sol. clorură de calciu 5 g %
3. HCl conc.
4. Sol. permanganat de potasiu 2 g %
5. Apă oxigenată

Modul de lucru

Intr-o eprubetă se iau 2 ml urină, 2 ml HCl conc. se adaugă apoi 2 ml cloroform şi 2 pic. din una din soluţiile: apă oxigenată, permanganat de K sau clorură de calciu. Se amestecă prin răsturnare fără agitare puternică. In prezenţa indicanului se produce o coloraţie violetă în partea apoasă şi albastră în partea cloroformică.

Observaţii

Adăugarea oxidantului se face cu atenţie câte puţin, deoarece surplusul oxidează indicanul în isatină care este incoloră.
Reacţia este cu atât mai intensă cu cât cantitatea de indican este

mai mare.

Eliminări crescute ale indicanului în urină apar în:

- afecţiuni intestinale (ocluzii intestinale)
- abcese pulmonare, hepatice, renale.

Eliminare crescută va fi în tulburări de absorbţie consecutive unei digestii insuficiente a proteinelor şi în cazul exagerării proceselor de putrefacţie intestinală.

DOZAREA ACIDITATII URINARE

Principiu

Aciditatea urinară este dată de fosfaţii monobazici şi de grupările -COOH ale aminoacizilor.

Aciditatea dată de fosfaţi se poate titra direct cu NaOH şi se numeşte aciditate de titrare, iar aciditatea dată de aminoacizi se titrează numai după blocarea grupărilor $-NH_2$ cu formol (aciditate formal).

Reactivi

1. Sol. NaOH N/10
2. Sol. formol 20 % neutralizată în prezenţa fenolftaleinei
3. Sol.indicator fenolftaleină 1 % .

Modul de lucru

Se recoltează urina din 24 de ore cu antiseptic (oxicianură de mercur).

Intr-un balon Erlenmeyer se pipetează: 10 ml urină, 30 ml apă distilată şi 1-2 picături de fenolftaleină. Se titrează cu NaOH N/10 până la viraj slab roz. Se notează numărul de ml de NaOH utilizaţi cu N.

Se adaugă apoi 5 ml formol. Se titrează mai departe tot cu NaOH N/10 până la viraj roz intens. Se notează numărul de ml de NaOH N/10 cu N'.

Calcul

Aciditatea urinară se exprimă în mod convenţional în ml soluţie NaOH N (normală).

Aciditatea de titrare = N x 10 = ml NaOH N la 1000 ml urină.

Aciditate formol = N' x 10 = ml NaOH N la 1000 ml urină.

Aciditate totală = aciditate titrare + aciditate formol.

Valori de referinţă

Aciditate de titrare = 25 ml NaOH N la 1000 ml urină.

Aciditate formol = 35 ml NaOH N la 1000 ml urină.

Raportul:

$$\frac{\text{aciditate de titrare}}{\text{aciditate formol}} \times 100 = 60 - 70 \text{ în mo normal}$$

Scanned with OKEN Scanner

METODE FIZICO-CHIMICE DE ANALIZA

Datorită sensibilităţii limitate, duratei şi izolării de multe ori dificile a componentului de analizat, se tinde spre înlocuirea metodelor clasice de determinare cu metode fizico-chimice de analiză.

Faţă de metodele chimice, metodele fizico-chimice de analiză se caracterizează în primul rând prin rapiditate, selectivitate şi sensibilitate mărită, însă exactitatea lor relativă (pe scară macro) este inferioară metodelor chimice obişnuite.

Pe scară micro însă, metodele fizico-chimice se remarcă şi printr-o exactitate mărită faţă de metodele chimice. In afară de aceasta, metodele fizico-chimice îşi găsesc aplicaţii largi şi în stabilirea structurii substanţelor, a diferitelor constante, elucidarea unor mecanisme de reacţie etc. (de ex. rezonanţa magnetică şi de spin, efectul Mössbauer, spectroscopia de masă).

Aceste metode permit de asemenea realizarea unor dispozitive pentru indicarea continuă a concentraţiei unei substanţe dintr-un amestec, ceea ce permite automatizarea.

Metodele fizico-chimice de analiză se clasifică în:

- metode optice
- electrochimice
- radiochimice
- cromatografice

Metode optice de analiză

Se bazează pe interacţiunea energiei radiante cu materia.

După proprietăţile optice folosite, metodele se grupează în:

- metode de absorbţie (colorimetrie, spectrofotometrie, turbidimetrie, nefelometrie);
- metode de emisie (spectrometrie, fotometria în flacără, fotoluminiscenţa, spectrografia Raman).

Se mai aplică refractometria, interferometria şi polarimetria.

Când un fascicol de raze de lumină I_o cade pe o suprafaţă omogenă, o parte din energia lui se pierde prin reflexie I_r, alta pătrunde şi se pierde prin absorbţie I_a, iar ceea ce rămâne se

transmite mai departe I_t.

$$I_o = I_a + I_r + I_t$$

Deoarece I_r este constantă se poate neglija şi atunci avem:

$$I_o = I_a + I_t$$

$$I_t = I_o - I_a$$

Dacă mediul este limpede, micşorarea intensităţii razei se datoreşte în primul rand absorbţiei energiei ei de către moleculele sau atomii substanţei prin care trece şi care absorb numai anumite porţiuni din spectrul UV (ultraviolet până la 400 nm), V(vizibil 400 - 700 nm) sau IR (infraroşu, peste 700 nm).

Când substanţa absoarbe în vizibil, ea apare colorată cu culoarea complementară. Se numesc complementare perechile de culori care împreună produc lumina albă. De exemplu, o substanţă care absoarbe roşul din spectrul vizibil apare colorată albastru-verzui.

Analiza chimică în care se determină concentraţia unor soluţii măsurând absorbţia radiaţiilor se numeşte absorbţiometrie.

Când se măsoară absorbţia în spectrul vizibil, metoda se numeşte colorimetrie, iar dacă se întrebuinţează în loc de lumină albă numai o porţiune mică din spectru, lumină monocromă, metoda se numeşte spectrofotometrie.

Colorimetria cuprinde metodele optice în care se determină absorbţia luminii de către substanţa de analizat sau se compară culoarea unui strat din substanţa respectivă cu culoarea unui etalon.

La baza analizelor colorimetrice stau legile lui Bouguer - Lambert şi a lui A.Beer.

Absorbţia luminii de către o substanţă colorată este proporţională cu concentraţia C a substanţei, grosimea de strat d şi coeficientul de absorbţie care depinde de natura substanţei, (in cazul când concentraţia este exprimată în moli/l şi se numeşte coeficient molar de extincţie).

Absorbţia se mai numeşte şi densitate optică (D) sau extincţie (E).

Metodele colorimetrice cele mai utilizate sunt:

- metoda seriilor etalon care constă în compararea

intensităţii culorii soluţiei de analizat cu o serie de soluţii etalon de concentraţii cunoscute şi crescânde, având aceeaşi grosime de strat cu soluţia de analizat. Dispozitivul utilizat se numeşte comparator Walpole (vezi determinarea pH-ului urinar);

2. metoda titrării colorimetrice sau metoda diluării, constă în compararea unui volum determinat al soluţiei necunoscute cu un volum egal de apă în care s-a adăugat o cantitate cunoscută de etalon până la egalarea intensităţilor;

3. metoda egalării constă în egalarea intensităţii culorii soluţiei de analizat cu o soluţie etalon prin variaţia înălţimii stratului absorbant. Aparatele cele mai utilizate sunt: colorimetrul Wolf şi colorimetrul de imersie Duboscq.

Determinări mai exacte se efectuiază utilizând filtre colorate care lasă să treacă numai o anumită bandă de lungimi de undă.

Filtrele pot fi de absorbţie şi de interferenţă.

Filtrele de absorbţie reţin radiaţiile nedorite prin absorbţie şi se confecţionează de obicei din sticlă, gelatină sau soluţii colorate. Se caracterizează prin lăţimea benzii transmise.

Filtrele de interferenţă transmit o bandă spectrală mult mai îngustă putând fi utilizate în domeniul ultraviolet, vizibil sau infraroşu.

Filtrele sunt notate de exemplu S_{43}, S_{47}, S_{53} etc., cifra indicând porţiunea de lumină care este lăsată să treacă şi lungimea ei de undă (S_{53} lasă să treacă razele din banda 530 Å. Ele au o aproximaţie de 10 - 12 Å, de aceea nu este indicată a treia cifră).

Filtrele care lasă să treacă o cantitate mai mare de lumină se notează cu L. Acestea se utilizează în cazul substanţelor care absorb puternic lumina (în cazuri speciale coloraţia urinii) şi în nefelometrie).

Aparatele utilizate sunt fotometrul Pulfrich şi IOR.

FOTOCOLORIMETRIA se bazează pe transformarea fluxului luminos în energie electrică prin intermediul celulelor fotoelectrice care înlocuiesc ochiul. Aparatul care funcţionează pe baza acestui principiu este FEK.

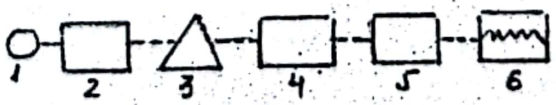
Culorile din spectrul vizibil

Lungimea de undă în nm	Culoarea	Culoarea complementară
400 - 450	Violet	Galben-verde
450 - 480	Albastru	Galben
480 - 490	Verde-albastru	Portocaliu
490 - 500	Albastru-verde	Roşu
500 - 560	Verde	Roşu-purpur
560 - 570	Galben-verde	Violet
570 - 590	Galben	Albastru
590 - 625	Portocaliu	Verde-albastru
625 - 750	Roşu	Albastru-verde

SPECTROFOTOMETRIA utilizează un monocromator capabil să selecteze fascicolul de raze monocromatice. Fascicolul de raze selectat este de cca 1 mμ (de la 180 - 2000 nm) incluzând domeniile ultraviolet, vizibil, infraroşu.

In general, aparatele folosite au următoarele părţi componente:

1. Sursa de radiaţii (bec cu filament de wolfram, lămpi spectrale).
2. Dispozitive de reglare a fascicolului de radiaţii (diafragmă, fantă cu deschidere variabilă etc.).
3. Dispozitiv de reglare a lungimii de undă - selectori de bandă - (filtre, monocromatoare cu prismă sau reţea de difracţie).
4. Suport pentru probe (cuve).
5. Receptori de radiaţie (fotoelement, ochiul).
6. Indicator sau înregistrator (galvanometru, mecanism de înregistrare, potenţiometru, osciloscop).



Schema bloc a unui aparat pentru determinarea extincţiei soluţiilor

Determinarea concentraţiei substanţei de analizat se face fie folosind o soluţie etalon, fie raportând la o curbă etalon.

Metoda curbei de etalonare

Când folosim pentru prima dată o metodă, se recomandă să se execute o curbă cu o gamă de soluţii etalon de concentraţii cunoscute, din substanţa cercetată şi reactivii ce iau parte la reacţie.

Este indicat să se refacă curba de câte ori un reactiv este schimbat.

Pentru stabilirea curbei etalon se iau în lucru cantităţi de substanţă care să se încadreze sub şi deasupra valorii normale întâlnite în mediul biologic studiat. Pentru obţinerea acestora se pleacă de obicei, de la o soluţie etalon, care se diluiază convenabil. Este obligatoriu să se facă pentru fiecare probă etalon mai multe determinări, stabilindu-se în final media aritmetică a extincţiilor care se vor înscrie pe curbă.

Pe abscisă se trec cantităţile în mg a substanţei luata în probă, iar pe ordonată extincţiile găsite. Volumul final, la care se diluiază soluţia colorată a etaloanelor, trebuie să fie acelaşi şi la probe.

Exemplu de trasare a curbei etalon pentru dozarea fosforului anorganic:

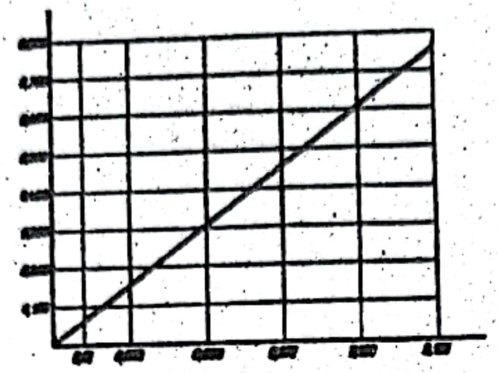
	1	2	3	4	5	6
Concentraţia în mg (P) din probă	0,010	0,025	0,050	0,075	0,1	0,125
Extincţia obţinută	0,061	0,155	0,310	0,456	0,6	0,757

Calcul

Extincţia obţinută pentru probă se raportează la curba etalon şi se obţine concentraţia în mg a substanţei cercetate.

La calcul se va ţine seama totodată de volumul de lichid biologic luat în lucru.

In cazul în care reacţia de culoare este proporţională cu concentraţia pe o zonă largă, curba este liniară şi trece prin origine.



Curba etalon pentru dozarea P anorganic

In acest caz calculul se poate simplifica înmulţind extincţia cu factorul de pantă.

Factorul de pantă se calculează astfel: se împarte concentraţia substanţei în mg din proba etalon la valoarea extincţiei pentru fiecare punct de pe curbă.

Cifrele găsite trebuie să fie foarte apropiate. Se face totalul acestor valori şi se împarte la numărul probelor. Valoarea obţinută se înmulţeşte cu extincţia probei.

Valoarea finală se raportează la volumul de lichid biologic la care vrem să exprimăm rezultatul.

Dacă reacţia de culoare nu este proporţională cu concentraţia, curba nu are caracter linear şi nu trece prin origine. In acest caz este obligatoriu să se citească valoarea în mg a probei numai pe curba etalon, fără a mai folosi factorul de pantă.

Metoda soluţiei etalon

In anumite situaţii se poate folosi o singură soluţie etalon, care se tratează la fel cu proba. Se citesc extincţiile etalonului şi probei faţă de martor (apă distilată sau reactivii folosiţi, în afara substanţei care generează culoarea) şi se calculează concentraţia substanţei cercetate astfel:

$$\frac{E_{et} \ldots\ldots\ldots C_{et}}{E_p \ldots\ldots\ldots C_p}$$

$$C_p = \frac{E_p}{E_{et}} \times C_{et}$$ = mg substanţă de analizat din volumul de lichid biologic luat în lucru.

E_{et} = extincţia etalonului

E_p = extincţia probei

C_{et} = concentraţia soluţiei etalon

C_p = concentraţia soluţiei probei

Stabilirea factorului de pantă

	Concentraţia în mg P din probă	E	mg P/E	Factorul de pantă (F)
1	0,010	0,061	0,010/0,061	0,160
2	0,025	0,155	0,025/0,155	0,161
3.	0,050	0,310	0,050/0,310	0,161
4.	0,075	0,456	0,075/0,456	0,163
5	0,100	0,602	0,100/0,602	0,166
6	0,125	0,757	0,125/0,757	0,165

Media pentru F a probelor etalon 0,163

Observaţii

Pentru ca o metodă colorimetrică să fie utilizată cu succes trebuie să îndeplinească următoarele condiţii:

1. Culoarea să fie specifică substanţei cercetate iar din soluţia etalon îndepărtate, pe cât posibil, substanţele care dau o culoare asemănătoare sau care pot micşora intensitatea culorii.

2. Culoarea să fie stabilă toată perioada de citire a extincţiilor. Se va stabili perioada în care culoarea are o intensitate maximă şi o stabilitate maximă.

3. Culoarea nu trebuie să varieze în funcţie de mediu (pH). Dacă avem variaţii ale culorii cu pH-ul se va standardiza valoarea pH-ului optim pentru maximum de culoare.

4. Culcarea să fie stabilă cu temperatura. In cazul

mer variații este indicat să se facă citirea la o anumită temperatură.

5. Intensitatea culerii să fie proporțională cu concentrația (să respecte legea Lamber-Beer). In cazul extincțiilor mai mari de 0,500 se diluiază produsul de analizat convenabil pentru a obține intensități de culoare care să se încadreze în limitele legii colorimetriei.

6. Este obligatoriu ca, ori de câte ori se trasează o curbă etalon, să se utilizeze fotocolorimetrul laboratorului și să nu se ia drept bune curbele obținute cu un alt aparat. Pentru a evita erori la citire (funcție de ochi) este recomandabil ca fiecare cu de laborator, care folosește fotocolorimetrul, să-și trasese personal curba etalon.

Flamfotometria

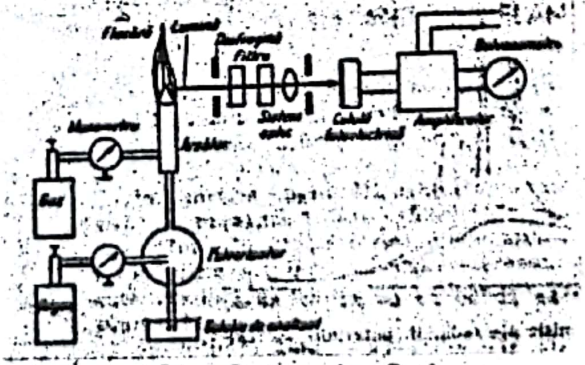
Este o metodă de analiză cantitativă, care permite determinarea concentrației metalelor alcaline și alcalino-teroase dintr-o soluție.

Principiul metodei se bazează pe faptul că intensitatea radiațiilor unui spectru de flacără este în funcție de numărul atomilor excitați și deci de cantitatea elementului respectiv.

Serul diluat cu apă distilată este fin pulverizat cu ajutorul unui pulverizator de sticlă alimentat cu aer comprimat și condus într-un arzător unde are loc excitarea ionilor.

Radiațiile emise sunt selectate cu un filtru de interferență corespunzător elementului căutat și cad apoi pe o celulă fotoelectrică.

Curentul fotoelectric este proporțional cu concentrația elementului respectiv din probă și este măsurat cu un galvanometru.



Schema flamfotometrului

1.- soluţia de cercetat; 2 - pulverizatorul; 3 - flacăra; 4,5,6,7 - sistemul optiv; 8 - receptorul.

Reactivi

1. Sol. NaCl 5,845 g %o
2. Sol. NaCl 16,4 g %o
3. Sol. KCl 0,7456 g %o
4. Sol. $CaCl_2$ 2,75 g %o
   - $CaCO_3$ 0,2492 g
   - HCl N 5 ml
   - Apă dist. până la 100 ml
5. Sol. LiCl 0,424 g %o
   - $LiCO_3$ 0,073 g
   - HCl N 2 ml
   - apă dist. până la 100 ml

Curba etalon pentru sodiu

mEq/l	Sol.NaCl 5,845 g %o (ml)	Apă distilată (ml)
160	16	până la 1000
140	14	"
120	12	"
100	10	"

Pentru dozarea Na, serul se diluiază 1/100

Curba etalon pentru potasiu

mEq/l	Sol. KCl 0,7456 g %o (ml)	Sol.NaCl 16,4 g %o (ml)	Apă distilată (ml)
8	16	10	până la 1000
6	12	10	"
4	8	10	"
2	4	10	"

Pentru dozarea K, serul se diluiază 1/50

Curba etalon pentru calciu

mEq/l	Sol.$CaCl_2$ 2,75 ‰ (ml)	Sol.NaCl 16,4 ‰ (ml)	Sol.KCl 0,7456 g ‰ (ml)	Apă distilată (ml)
2	4	50	50	până la 1000
4	8	50	50	"
5	10	50	50	"
6	12	50	50	"

Pentru dozarea Ca, serul se diluiază 1/10

Curba etalon pentru litiu

mEq/l	$CaCl_2$ 2 ‰ ml	NaCl 16,4 ‰ ml	KCl 0,7456 ‰ ml	LiCl 0,424 ‰ ml	Apă distilată ml
0	10	50	50	-	până la 1000
1	10	50	50	5	"
2	10	50	50	10	"
3	10	50	50	15	"
4	10	50	50	20	"

Pentru dozarea Li, serul se diluiază 1/10.

Modul de lucru

Analiza flamfotometrică cuprinde trei etape importante:

- etalonarea imaginii flăcării prin stabilirea punctului de inversiune al acetilenei;
- stabilirea curbei etalon;
- determinarea propriu zisă.

Pentru a obține rezultate corecte este necesar să se mențină constante condițiile de funcționare ale aparatului și flăcării, concentrația soluției fiind singura variabilă.

Având toate indicatoarele în poziția 0 (zero) și filtrul corespunzător elemntului cercetat, se deschide progresiv robinetul buteliei de aer comprimat, pentru realizarea presiunii cuprin-

să între 0,20 - 0,30 atmosfere, se deschide apoi progresiv robinetul buteliei de acetilenă şi se reglează presiunea până la o diferenţă de nivel de 30 - 40 mm coloana de apă.

După realizarea raportului favorabil de presiune între acetilenă şi aer comprimat, se aprinde amestecul şi se pulverizează apă distilată timp de 20 minute pentru spălarea aparatului.

Etalonarea imaginii flăcării prin stabilirea punctului de inversiune al acetilenei se face prin pulverizarea unei soluţii de concentraţie medie. Se deschide galvanometrul şi apoi diafragma. Deschiderea diafragmei nu trebuie să depăşească 2/3 - 3/4 din diametrul total. Se citeşte extincţia pe una din scările aparatului prin variaţia raportului de presiune dintre acetilenă şi aer. Punctul maxim al valorilor citite (după care aceste valori încep să scadă) reprezintă punctul de inversiune al acetilenei. Presiunea corespunzătoare reprezintă presiunea optimă de lucru.

Pentru stabilirea curbei etalon se pulverizează soluţia etalon de concentraţie normală, se deschide galvanometrul şi se citeşte extincţia.

Se procedează identic şi cu celelalte soluţii etalon, de la concentraţia cea mai mică până la concentraţia cea mai mare, având grijă ca după fiecare determinare să se spele aparatul.

Cu extincţiile obţinute se trasează curba etalon a cărei aliură depinde de caracteristicile substanţei studiate.

Punerea aparatului în funcţie pentru o nouă determinare necesită o operaţie de etalonare numai cu soluţia de concentraţie normală, pentru a stabili deschiderea de fantă care să asigure o extincţie egală cu cea precedentă.

Datorită impurităţilor din acetilenă este necesar ca după câteva determinări, după stabilirea deschiderii de fantă şi citirea soluţiei etalon de concentraţie normală, să se revizuiască întreaga curbă etalon. Intre determinări se închide galvanometrul.

Calcul

Funcţie de extincţia căpătată, se citeşte concentraţia elementului cercetat direct pe curbă.

VALORILE NORMALE ALE PRINCIPALILOR CONSTITUENȚI CHIMICI DIN SÂNGE, PLASMA SAU SER ȘI URINA

- Corpi cetonici: urină - 12,5-38 mg/100 sub formă de acid piruvic
  1-10 mg/24 ore, corpi cetonici.

- Aminotransferase: GOT (aspartat aminotransferaza , AST)
  adulți: 2 - 20 UI
  copii sub 3 luni: până la 40 UI
  copii 3 luni - 1 an, până la 28 UI
  GPT (alanin aminotransferaza,ALT)
  adulți: 2 - 16 UI
  copii până la 5 ani, 0,2 - 13 UI.

- Amilaza : valorile variază cu metoda utilizată)
  ser: 230 -2070 UI/l
  urină: până la 8000 UI/L
  salivă: peste 1,6 x 10^5 UI/l

- α_1-Antitripsină: ser: 180 mg/100 ml

- Bilirubină: ser, Totală: 0,2-1,2 mg/100 (3,5-20,5 µmol/l)
  Directă (conjugată): 0,1 - 0,4 mg/100
  (7 µmol/l)
  Indirectă: 0,2-0,7 mg/100, (12 µmol/l)

- Calciu: ser; 8,5 -10,3 mg/100; 2,1-2,6 mmol/l)
  Valorile variază cu concentrația albuminei

  Calciu ionizat: ser, 4,25 - 5,25 mg/100; 1,7 - 2,9 µmol/l

- Clor: ser sau plasmă: 96-106 mEq/l; (96-106 mmol/l).

- Colesterol total: ser sau plasmă; 150 - 265 mg/100;
  (3,9 - 6,85 mmol/l). Valorile variază cu vârsta).

Vârsta	Colesterol (mg/dl)	TG (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	
				Bărbați	Femei
29	120 - 240	10 - 140	170	45 ± 12	55 ± 12
30 - 39	140 - 270	10 - 150	190		

Vârsta	Colesterol (mg/dl)	TG (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)
40 - 49	150 - 310	10 - 160	190	
49	160 - 330	10 - 190	210	

- Colesterol esterificat: ser, 65 - 75 % din colesterol total.
- Cupru: ser sau plasmă, 100 - 200 µg/100 (16 - 31 µ mol/1).
- Creatin fosfokinază (CPK) : ser, 10 - 50 UI/1, la 30°C,
- Creatin fosfokinază izoenzime: fracţiunea 1,BB - 0 % din valoarea totală normală.
  fracţiunea 3,MB - 0 - 3
  fracţiunea 3,MM - 97 - 100
- Creatinină: ser sau plasmă, adulţi: 0,7 - 1,5 mg/100
  (62 - 132 umol/1)
  copii: 1,0 - 2,0 mg/100
  urină: 800 - 1200 mg/24 ore
- Feritină: ser, adulţi, femei: 2 - 20 ng/ml
  bărbaţi: 30 - 300 ng/ml
  copii până la 15 ani: 7 - 140 ng/ml
- Glucoză: ser sau plasmă, 65 - 110 mg/100 (3,6-6,1 mmol/1)
- Fosfor anorganic: ser, 3 - 4,5 mg/100 (1,0 - 1,5 mmol/1)
- Acid lactic: sânge venos, 4 - 16 mg/100 (0,44 - 1,8 mmol/1)
- Lactat dehidrogenază (LDH), ser: 55 - 140 UI/1 la 30°C, variază cu metoda utilizată.
- Lipaza: ser, 150 U/l
- Lipide totale: ser, 450 - 1000 mg/100 (4,5 - 10 g/1)
- Magneziu (Mg^{2+}): ser, 1,8 - 3,0 mg/100; 1,5-2,0 mEq/1;
  0,75 - 1,25 mmol/1
- Natriu (Na^{+}) : ser, 324 mg/100, 135 -145 mEq/1 (135 - 145 mmol/1)
- Fosfataza acidă: ser, adulţi: 0,27 - 0,54 mU/ml
  copii: 0,18 - 4,32 mU/ml

- Fosfataza alcalină: ser,
  adulţi: 20 - 40 mU/ml
  copii: 38 - 138 mU/ml
- Fosfor anorganic: ser, 3 - 4,5 mg/100, (1 - 1,5 mmol/l)
- Potasiu: ser sau plasmă, 3,5 - 5,0 mEq/l, (3,5 - 5 mmol/l).
- Proteine: ser,
  Totale: 6 - 8 g/dl, (60 - 80 g/l)
  Albumine: 3,5 - 5,5 g/dl, (35 - 55 g/l)
  Globuline: 2 - 3,6 g/dl, (20 - 36 g/l)
  Fibrinogen (plasmă): 0,2 - 0,6 g/dl, (2-6 g/l).
- Fracţiunile proteice determinate prin electroforeză:
  albumine: 52 - 68 % din proteinele totale
  globuline: 2,4 - 4,4 " "
  globuline: 6,1 - 10,1 " "
  globuline: 8,5 - 14,5 " "
  globuline: 10 - 21 " "
- Gama globulinele determinate prin imunoelectroforeza:
  IgA - 90 - 450 mg/dl
  IgG - 700 - 1500 mg/dl
  IgM - 40 - 250 mg/dl
  IgD - 0,3 - 40 mg/dl
  IgE - 0,006 - 0,16 mg/dl
- Acid piruvic, ser: 200 - 400 mg/100, (23 - 45 µmol/l)
- Trigliceride, ser: 165 mg/100, (1,9 mmol/l)
- Uree: ser, adulţi: 20 - 40 mg/100
  bătrâni 15 - 50 mg/100
  urină: 200 - 250 mg/100
- Acid uric, ser sau plasmă:
  bărbaţi: 3 - 9 mg/100, (0,18 - 0,54 mmol/l)
  femei: 2,5 - 7,5 mg/100, (0,15 - 0,45 mmol/l)
  urină: 40 - 70 mg/100
- Zinc, ser: 50 - 150 ug/100, (7,65 - 22,95 µmol/l)
- Lecitină (fosfatidilcolină): ser, 150 - 250 mg/100 ml
- NaCl: ser, 580 mg/100

Scanned with OKEN Scanner

- NaCl: urină, 1000 - 1200 mg/100; 120 - 200 mEq/l;
  10 - 15 g/g/24 ore
- Rezerva alcalină, ser: 22 - 29 mEq/l

Scanned with OKEN Scanner

B I B L I O G R A F I E

1. AMELUNG D. - Diagnosticul enzimatic al bolilor interne, Ed.Medicală, Buc. (1965)
2. BAILEY J.L. - Techniques in Protein Chemistry, Ed.Elsevier Publishing Company, Amsterdam (1967)
3. BARKER S.E., SUMMERSON W.H. - J.B.C., 138, 535 (1941)
4. BATCU A., FAIGHELIS C., SERBAN F. - Biochimie Medicală, Lucrări practice, vol. I şi II, Ed. I.M.F.Iaşi 1956
5. BERGMEYER H.U., BERNET E., HESS B. - Methods of Enzymatic Analisys, Ed.H.U. Bergmeyer Verlag Chemie, C.M.B.H. Weinheim/Bergstr. (1965)
6. BURTIS C.A. - "Tietz text book of Clinical Chemistry", R.Ashwood ed., (1994) (second ed.)
7. BUTLER E. - Reed cell metabolism - Biochemical Methods- 2 - End Edition
8. BOULANGER P., POLONOVSCHI J., TAYEU P., MANDEL P., BISETRE G. - Biochimie medicale, Ed. 8-a, Masson et C^ie, Fasc.III (1960)
9. CUCUIANU M. - Biochimie clinică, Ed.Dacia, Cluj-Napoca, (1977)
10. CUCUIANU M. - Biochimie, aplicaţii clinice, Ed. Dacia, Cluj-Napoca (1991)
11. FIESSINGER N. - Les diagnostics biologiques et fonctionnels, Ed.Librairie Maloine, Paris (1949)
12. FISKE C.H., SUBBAROW Y. - The Colorimetric Determination of Phosphorus, J.Biol.Chem., 66, 375 (1925)
13. GEORGESCU P., PAUNESCU P. - Metode biochimice de diagnostic şi cercetare, Ed.Medicală, Buc. (1960)
14. GORNALL G., ALLAN - Applied Biochemistry of Clinical Disorders, (1981)
15. HENRI R. - Clinical Chemistry Principles and Techniques, New-York (1964)
16. HESS B. - Enzymes in Blood Plasma, Ed.Academic Press, N.Y. (1963)
17. IVANOVICI G., FUICREA I. - Diagnosticul de laborator în practica medicală Ed.medicală Buc. (1990)

18. LECOQ R. - Manuel D'Analyses Medicales et de Biologie Clinique, Editions Doin (1967)
19. LITEANU C., HOPIRTEAN E. - Chimie analitică cantitativă. Ed.did. şi ped.., Buc., ediţia VI-a
20. LOISLLEUR J. - Techniques de laboratoires, Ed. Masson, Paris (1954)
21. LUCA C. - pH-ul şi aplicaţiile lui, Ed.Tehnică, Buc. (1964)
22. MANTA I., CUCUIANU M., BENGA G., HODARNAU H. - Metode biochimice în laboratorul clinic, Ed.Dacia, Cluj-Napoca (1976)
23. MINCU J. - Boli de metabolism şi nutriţie, Ed.Did. şi Ped., Buc. (1977)
24. NUTA GH., BUSNEAG C. - Investigaţii biochimice, Ed.Did. şi Ped. Buc. (1977)
25. PAUNESCU P., PODEANU A. - Ghid de date biologice şi patologice, Ed.Medicală , Buc.(1966)
26. RADU M.V. - Sistemul Internaţional de unităţi în medicină, Ed.Medicală, Buc. (1986)
27. RACKER E. - Methods in Enzymology, Ed.S.P.Colowick, Acad.Press, N.Y. Vol.I, (1965)
28. RAPOPORT S.M., RADERECHT H.J. - Physologisch chemisches Praktikum, Ed.VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1977)
29. REITMANS F. - Amer.J.Clin.Path., 28, 56 (1957)
30. RICHTERICH R.P. - Clinische Chemie, Ed.Basel (1960)
31. SCHMIDT R.M. - Der Liquor cerebro-spinalis, Ed.VEB Volk und Gesuntheit, Berlin (1968)
32. SIBI M. - Colecţie de metode de laborator (1947-1963)
33. TARLONTIN J.C. - Microdeterminatiom du glucose dans les liquides biologiques par la methode a l'orte-teluidine, Ann.Biol.Clin. 1-2, 173 (1966)
34. TANASESCU C. - Biochimie Medicală. Lucrări practice, Ed.Did. şi Ped., Buc. (1966)
35. TIXIER M., CLAUDE J. - Ann. Biol. Clin. 32, 53 (1974)
36. YOSHIKAWA H. - Collected Papers 1953 - 1971, Ed.Yoshikawa (1971)
37. MINISTERUL SANATATII, ACADEMIA DE STIINTE MEDICALE - "Metode curente pentru analize de laborator clinic", Ed. Medicală, Buc. (1982)

Scanned with OKEN Scanner